

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



O papel da fibronectina na segmentação da mesoderme no embrião de galinha

Ana Lina Pereira Rodrigues Cabral

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Animal



O papel da fibronectina na segmentação da mesoderme no embrião de galinha

Ana Lina Pereira Rodrigues Cabral

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Dissertação orientada por:

Prof^a Dr^a Sólveig Thorsteinsdóttir e Prof^a Dr^a Isabel Palmeirim

2009

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. Introdução.....	1
1.1. A segmentação nos Vertebrados.....	1
1.2. Controlo espacio-temporal da somitogénese.....	2
1.3. A via de sinalização Notch na formação dos sómitos.....	3
1.4. A via de sinalização Wnt na formação dos sómitos	4
1.5. Os gradientes antagónicos FGF8 e ácido retinóico	4
1.6. Padronização rostro-caudal dos sómitos, a formação da fronteira e a epitelização.....	6
1.7. As proteínas cinases da família Eph e os seus ligandos, os Ephrins	6
1.8. A matriz extracelular na somitogénese: a fibronectina	8
1.9. Objectivos:	11
2. Materiais e Métodos.....	12
2.1. Obtenção de embriões.....	12
2.2. Preparação do meio de cultura	12
2.2.1. Remoção ou redução da FN do soro	12
2.3. Micromanipulações cirúrgicas	13
2.3.1. Isolamento e cultura de explantes <i>in vitro</i>	13
2.3.1.1. Inibição de fibrillogénese pelo fragmento N-terminal de fibronectina de 70KDa	13
2.3.1.2. Inibição da sinalização Notch por DAPT	13
2.3.2. Isolamento e cultura de MPSs <i>in vitro</i>	14
2.3.2.1. Ensaio de inibição pelo fragmento 70kDa.....	14
2.4. Hibridação <i>in situ</i>	14
2.5. Imunofluorescência	15
2.6. Obtenção e análise de imagens.....	15

2.7. A análise estatística	16
Resultados.....	17
3.1. O programa genético de segmentação molecular em MPSs isoladas ocorre normalmente.	17
3.2. A segmentação molecular em explantes cultivados com o fragmento de 70kDa não ocorre normalmente.	18
3.3. A segmentação molecular em MPS impedidas de montar matriz com a FN do soro não ocorre normalmente.	20
3.4. Correlação entre o efeito da inibição da fibrilogénese de FN e o efeito de inibição de Notch	21
3.5. A falha na sómitogénese está correlacionada com o desaparecimento de <i>meso1</i>	24
3.6. A segmentação molecular é uma propriedade intrínseca das MPSs ou depende de uma matriz de FN?	26
4. Discussão	29
4.1. A matriz da fibronectina influencia a segmentação tanto ao nível morfológico como ao nível da expressão génica segmentar.	29
4.2. A sinalização Notch activa a expressão de <i>meso1</i> na MPS rostral.	30
4.3. Ausência de Notch e de FN provocam efeitos parecidos na segmentação.....	31
4.4. A segmentação molecular é o balanço da conjugação da sinalização intrínseca à MPS e da dos tecidos envolventes.	32
4.5. A matriz de fibronectina participa na regulação da expressão de <i>delta1</i> na MPS caudal?.....	33
Bibliografia.....	35

Agradecimentos

Especialmente à minha orientadora, prof^a Sólveig Thorsteinsdóttir, primeiramente por me ter aceitado como mestranda, por ter pensado e sugerido este projecto, por ter manifestado muita paciência, simpatia, optimismo e sabedoria em todos os momentos da realização desta tese, por ter mantido sempre presente mesmo à distância, e sobretudo pela amizade.

À prof^a Isabel Palmeirim por ter aceitado ser a minha co-orientadora e pela colaboração na revisão do trabalho.

Ao Pedro Rifes pelas orientações no laboratório, na microscopia e principalmente por ter estado sempre disponível a esclarecer todas as minhas dúvidas.

Ao Dr. Gabriel Martins pelos valorosos conselhos técnicos.

À Prof. Gabriela Rodrigues pelos, conselhos e sugestões muito úteis.

Ao Instituto Português de Apoio ao Desenvolvimento pela bolsa concedida, sem a qual seria impossível realizar este trabalho;

Ao Ministério da Educação e Ensino superior de Cabo Verde pelo apoio concedido.

Ao Prof. Élio Sucena pelo apoio e pela confiança.

Aos meus colegas Luís Marques, Carla Pereira, Tomás Azevedo e Raquel Vaz pelo companheirismo e pelos apoios técnicos.

À Ana Gaspar pela preciosa ajuda no laboratório e pelos instantes de descontração.

Aos alunos cabo-verdianos desta faculdade (sem excepção) pelos momentos de descontração, pelo apoio e pelo interesse demonstrado. Em particular, ao amigo João Tavares pela ajuda na formatação do trabalho, pelo companheirismo, pelas trocas de angústias, pelo apoio e principalmente pela amizade.

Ao menino Moisés pela companhia e pelos imensos “porquês” e “para quê”?

À Lisete, ao Jorge, ao Vlã e ao Moisés por terem partilhado comigo o seu lar.

Ao José Carlos pelo apoio moral.

Finalmente aos meus pais e irmãos por terem aceitado e suportado a minha ausência, e por me terem ensinado o verdadeiro sentido da palavra sacrifício. Em especial ao meu marido Paulo Cabral por ter aceitado a minha ausência à vida social, por ser meu companheiro de todas as horas.

Ao sobrinho Jaquilson, que se viu privado da minha companhia, pela insistente pergunta “qui dia bu ta bem”?

Resumo

Durante o desenvolvimento embrionário dos Vertebrados a mesoderme presomítica (MPS) é progressivamente dividida em segmentos, denominados os sómitos. No embrião de galinha, os sómitos formam-se com uma periodicidade de 90 minutos e pensa-se que essa periodicidade seja regulada por genes de expressão cíclica envolvidos nas vias Notch e Wnt e a sua resposta a gradientes de FGF/Wnt e ácido retinóico. Porém, a reorganização celular durante a somitogénese envolve também moléculas de adesão e de matriz extracelular com particular destaque para a fibronectina (FN). Além de estar associada a dinâmicas celulares subjacentes a segmentação morfológica, dados preliminares indicaram que possa também ter um envolvimento na segmentação molecular. Sendo assim, o objectivo deste trabalho de pesquisa foi de verificar o papel da FN na segmentação no embrião de galinha. Através de aplicação de inibidores de fibrillogénese de FN e de sinalização Notch em sistemas de culturas de explantes e de MPS isoladas seguido de uma marcação da expressão génica, foram revelados que a matriz de FN é necessária para a segmentação tanto a nível morfológico como a nível de expressão génica segmentar (de *delta1* e de *meso1*). Adicionalmente foi observado que os efeitos da inibição da fibrillogénese da FN produzem um fenótipo semelhante a inibição da sinalização Notch. Foi constatado que a sinalização Notch activa a expressão de *meso1* que regula a segmentação e que tanto a ausência de sinalização Notch como a ausência de uma matriz de FN provocam, na expressão génica segmentar, efeitos de perturbação muito parecidos. Finalmente foi observado que a segmentação molecular parece não apenas ser resultado de sinalização intrínseca à MPS, mas é também influenciada pela ectoderme, comprovada pela existência de regulação da FN exógena sobre a segmentação molecular na parte rostral da MPS e sobre a expressão de *delta1* na sua região caudal.

PALAVRAS - CHAVE: Fibronectina, Somitogénese, Mesoderme presomítica, Galinha, Notch

Abstract

During vertebrate embryonic development the presomitic mesoderm (PSM) is gradually divided into segments, the somites. In the chick embryo one pair of somites forms every 90 minutes. It is generally thought that the tight temporal and spatial control of somitogenesis is regulated by the cyclic expression of genes of the Notch and Wnt signaling pathways, and the response of their protein products to retinoic acid and FGF/Wnt gradients. The cellular reorganization involved in somitogenesis requires adhesion to the extracellular matrix particularly to fibronectin (FN). In addition to regulating the cellular dynamics underlying the morphological segmentation of the PSM, preliminary data indicated that it may also be involved in its molecular segmentation. The objective of this thesis project was to address this issue. Through the application of inhibitors of FN fibrillogenesis and Notch signaling in cultures of embryo explants and isolated PSMs and the subsequent assessment of mRNA expression patterns, it was revealed that the FN matrix is required for segmentation both at the morphological level and at the level of the expression of *delta1* and *meso1*. Furthermore, the effect of inhibiting FN fibrillogenesis produced a phenotype that was very similar to the one obtained upon inhibiting Notch signaling. It was found that Notch signaling activates *meso1* expression which in turn regulates segmentation and that absence of Notch signaling and a FN matrix cause a similar disturbance in the expression of *delta1* and *meso1*. Finally it was observed that molecular segmentation appears to be not only the result of intrinsic PSM signaling, but is also influenced by ectoderm, as evidenced by the requirement for exogenous FN for molecular segmentation in the rostral PSM and for *delta1* expression in the caudal PSM.

KEY WORDS: Fibronectin, Somitogenesis, Presomitic mesoderm, Chick, Notch

1. Introdução

1.1. A segmentação nos Vertebrados

Uma das características mais proeminentes dos embriões de Vertebrados é a sua segmentação, manifestada pela produção repetida dos sómitos. Durante a gastrulação surgem continuamente da linha primitiva, e mais tarde do botão caudal, células que se juntam num rolo de células mesenquimatosas de cada um dos lados do tubo neural, formando um tecido denominado a mesoderme presomítica (MPS). Depois de um tempo definido na MPS, um conjunto de aproximadamente 2000 células situadas na parte rostral de cada MPS juntam-se progressivamente, formando blocos distintos de células epiteliais, os sómitos (Gossler e Hrabe de Angelis 1998).

Na MPS tem lugar uma série sequencial de acontecimentos, resumidos em estabelecimento do padrão de segmentação ao nível molecular, a separação física do tecido correspondente ao futuro sómito da MPS não segmentada e o estabelecimento das fronteiras durante a segmentação morfológica, o rearranjo das células no sómito em formação, que, no conjunto, culmina com a produção de um par de sómitos epiteliais (Glazier et al. 2008). Estes eventos conduzem a MPS não segmentada ao destino segmentado. É de notar que à medida que as células progridem no seu desenvolvimento de caudal para rostral, as características mesenquimatosas vão sendo perdidas a favor das epiteliais (Dubrulle e Pourquié 2004) e vão-se periodicamente destacando um par de sómitos no sentido rostral para caudal.

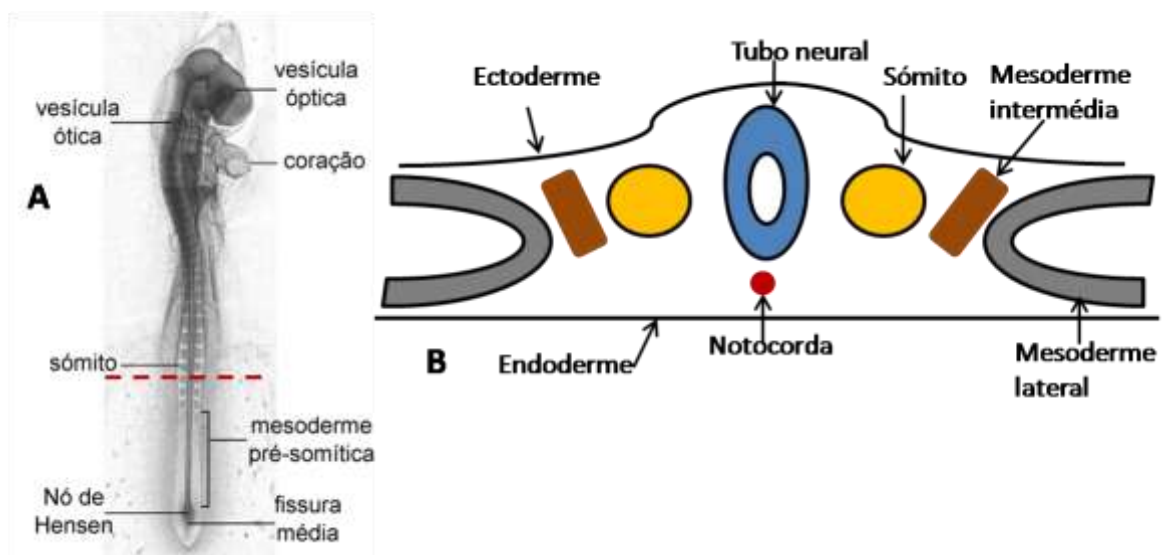


Fig.1. Embrião de galinha. **A)** Principais estruturas do embrião de galinha; **B)** Corte transversal ao nível do sómito SIII (tracejado vermelho no painel)

Os sómitos são estruturas transitórias com uma compartimentalização caudo-rostral muito importante no padrão de segmentação dos embriões, dando origem a células que formam estruturas importantes no plano do corpo altamente organizado dos Vertebrados como: vértebras e costelas, músculos esqueléticos e tendões associados e derme da pele dorsal (Andrade et al. 2007).

1.2. Controlo espacio-temporal da somitogénese

A segmentação é um processo altamente regulado no espaço e no tempo. Em intervalos regulares, precisamente definidos, sendo de 90 minutos no embrião de galinha, destaca-se um par de novos sómitos (Christ e Ordahl 1995), em perfeita sincronia entre a esquerda e a direita até completar os 50 pares existentes nesta espécie. No entanto, a gastrulação continua a fornecer células à MPS, pelo que a dimensão da MPS continua a ser a mesma durante a grande parte do tempo em que a somitogénese procede. Esta regulação é necessária para a coerência comportamental das células, requisito para a criação de padrões de organização multicelulares que posteriormente diferenciam nas estruturas metaméricas. Esta coordenação e periodicidade sugere a existência de um controlador interno da ritimicidade.

Com o objectivo de explicar a periodicidade da somitogénese dos Vertebrados foi postulada por Cooke e Zeeman em 1976, a existência de um relógio de segmentação que contempla a existência, ao longo do eixo antero-posterior, de uma informação posicional que determina um estado permissivo e um não permissivo em que sincronicamente as células da MPS passam daquele para este estado e se organizam em sómitos (Cooke e Zeeman 1976).

A descoberta do padrão de expressão cíclica do gene *hairy1* na MPS do embrião de galinha (Palmeirim et al.1997) foi a primeira evidência molecular do relógio de segmentação dos Vertebrados. O seu padrão de expressão cíclica oscila da região não segmentada da MPS, para a segmentada durante 90 min, a coincidir com o tempo de formação de um par de sómitos. Portanto a sua ritimicidade de expressão está correlacionado com a formação progressiva dos sómitos (Palmeirim et al.1997). Experiências de cultura de MPSs isolada dos tecidos vizinhos, demonstraram que a oscilação do *hairy 1* é uma propriedade das células da MPS, sugerindo que cada célula passa por um número determinado de oscilações durante o seu trajecto da linha primitiva até ser incorporada num sómito (Palmeirim et al.1997).

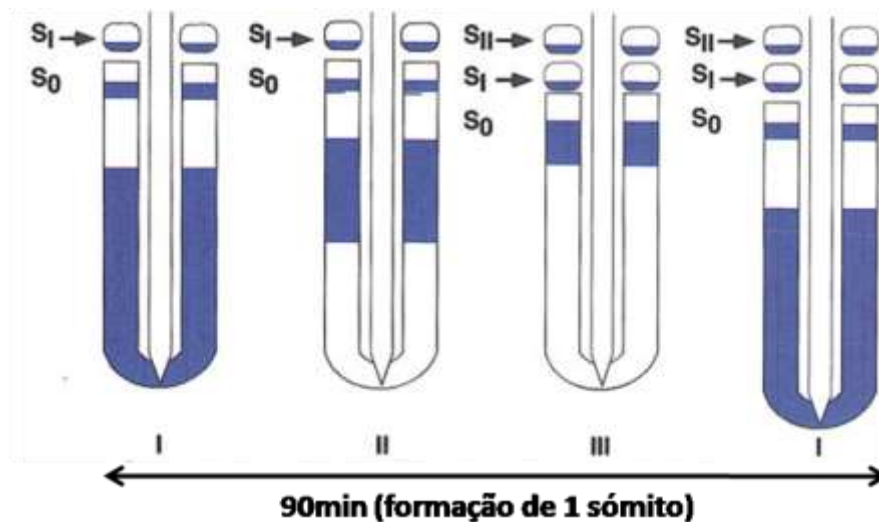


Fig.2. Representação esquemática do padrão de expressão cíclica do gene *hairy1* na MPS. A expressão ondula da MPS caudal, forma uma banda na MPS rostral que marca a parte caudal do sômito a formar. A expressão periódica é separada em três estádios que são repetidos a cada 90 minutos, coincidindo com a formação de novo sômitos. Adaptado de Palmeirim et al. 1997.

Pensa-se que a base molecular do relógio se traduz, de uma forma ainda desconhecida, na expressão cíclica de um conjunto de genes nas células da MPS (Saga 2007). Pensa-se que as proteínas codificadas por estes genes interagem com moléculas sinalizadoras (e.g. Fgf8 e ácido retinóico) que se distribuem em gradientes longitudinais ao longo do eixo antero-posterior da MPS e que essa interação estabelece um ritmo que regula a organização das células em sômitos (Dubrulle e Pourquié 2004; Andrade et al. 2007).

1.3. A via de sinalização Notch na formação dos sômitos

Um dos agentes chave no relógio molecular é a via de sinalização Notch (Bessho e tal. 2003). Pertencentes a esta via de sinalização, foram identificados genes com padrões de expressão dinâmica durante a somitogénese em peixes, anfíbios, aves e mamíferos, sendo *c-hairy2* (Jouve et al. 2000) *c-Hey2* (Leimeister et al. 2000) e *Lunatic fringe* (*Lfng*) (McGrew et al. 1998; Aulehla e Johnson 1999) alguns deles (revisto em Andrade et al. 2007). Mutações que afectam a sinalização Notch perturbam tanto a função do relógio de segmentação como a padronização antero-posterior do sômito, provocando deformações ósseas e doenças em ratinhos e no Homem (revisto em Andrade et al., 2007). Experiências de perturbação dos genes envolvidos na sinalização Notch, quer por manipulação dos seus domínios, quer por mutações genéticas, apresentam defeitos na segmentação (Takahashi et al. 2000; Andrade et al. 2007). A activação e a inibição rítmica da sinalização Notch gerada pela expressão pulsátil de *Lfng* em ratinho e galinha e *DeltaC* em peixe zebra, deixa uma

ritimicidade na formação das fronteiras intersomíticas (Aulehla e Johnson 1999; Forsberg et al. 1998; Jiang et al. 2000; Luminy e City 2003), por isso no destacamento dos sómitos.

Além de mediar a comunicação entre células, a sinalização Notch mantém a sincronia de oscilação dos genes cíclicos nas células da MPS, através do sistema de retroregulação de Notch, explicando o comportamento periódico na segmentação da MPS (Dale et al. 2003). No ratinho, faz parte desta regulação a proteína Hes7, homólogo da proteína Hairy1 na galinha, que no embrião de ratinho participa na expressão cíclica e sincronizada do RNAm de Hes7 e do Lfng (Bessho et al. 2003). Foi demonstrado que Lfng reprime a sua própria expressão através da modulação da cascata Notch no embrião de galinha, e por isso pensa-se que o “feedback” negativo do Lfng é uma base molecular que mantém a ritmicidade da expressão dos genes do relógio da segmentação (Dale et al. 2003).

1.4. A via de sinalização Wnt na formação dos sómitos

Estudos recentes efectuados em embriões de ratinho sugerem que a via de sinalização Wnt actua de modo recíproco com a via de sinalização Notch (Ishikawa et al. 2004) o que dificulta a compreensão dos papéis de cada um. Assim como Notch, Wnt tem reguladores negativos que funcionam como parte integrante do relógio e o suprimem periodicamente. Estudos realizados em ratinho concluem que Wnt forma um gradiente ao longo da MPS que interage com a via Notch através do Axin2, este que define a activação periodica e alternada destas duas vias. Deste modo as células da MPS ficam expostas a “ondas” alternadas de sinalização Wnt e Notch através do controlo do relógio molecular (Aulehla et al. 2003), portanto a periodicidade da formação das fronteiras intersomíticas é conduzido pelas duas vias, através do controlo do relógio molecular (Gibb et al. 2009).

Também em galinha a expressão dos componentes da cascata Wnt são regulados pela sinalização Notch, sendo uma regulação negativa para o abrandamento da oscilação do relógio molecular no domínio rostral da MPS (Gibb et al. 2009). Em ratinho o Wnt3a parece controlar e integrar os processos de alongamento do eixo do corpo, de informação posicional e de segmentação (Aulehla et al. 2003), mas ainda não se sabe se o mesmo acontece no embrião de galinha.

1.5. Os gradientes antagónicos FGF8 e ácido retinóico

O factor parácrino FGF8 é fortemente expresso na MPS mais caudal, ao nível da linha primitiva e do Nó de Hensen e diminui gradualmente para a MPS anterior. Estudos efectuados em galinha indicam que esta diminuição gradual é o resultado de uma

degradação progressiva do RNAm de *Fgf8* transcrito nas células do botão caudal e posteriormente herdadas pelos descendentes na MPS, em vez de uma transcrição constante ao longo da MPS (Dubrulle e Pourquié, 2004) . Esta diminuição caudo-rostral estabelece um gradiente que define a frente de determinação, localizada na região do sómito –IV, entre uma região posterior onde as células mantêm-se indiferenciadas e uma anterior onde elas já são competentes para responder ao relógio de segmentação e se organizarem em sómitos (Dubrulle et al. 2001). Entretanto, é preciso haver regulação negativa de *Fgf8* ao nível da frente de determinação para permitir o avanço da MPS para a segmentação. Uma variação dos seus níveis altera o local da frente de determinação e a formação dos sómitos (Dubrulle et al. 2001).

Contrariamente ao FGF8, o ácido retinóico é sintetizado em níveis elevados nos sómitos e difunde anterior e posteriormente, formando um gradiente que antagoniza o gradiente de FGF8 e conjuntamente com FGF8 determina o posicionamento da frente de determinação. O ácido retinóico é um derivado da vitamina A envolvido na manutenção da simetria bilateral dos sómitos durante o desenvolvimento (Vermot et al. 2005). A sua implicação na segmentação foi demonstrada em galinha, ratinho e *Xenopus*, em que a sua perturbação afecta a sincronia na formação dos sómitos, o estabelecimento de fronteiras e a extensão do eixo do embrião (Vermot et al. 2005; Moreno e Kintner 2004)

A sinalização oposta mutuamente inibitória de FGF8 e ácido retinóico via *Raldh2* sugerem que têm um controle sobre o início da formação dos sómitos, regulando a segmentação da MPS enquanto o eixo se estende caudalmente (Maden e Storey 2003). Estes dois gradientes mantêm o equilíbrio necessário entre o momento de proliferação e o de diferenciação das células da PSM (Diez e Storey 2004), tendo assim um controle sobre o posicionamento da fronteira do sómito (Andrade et al. 2007) .

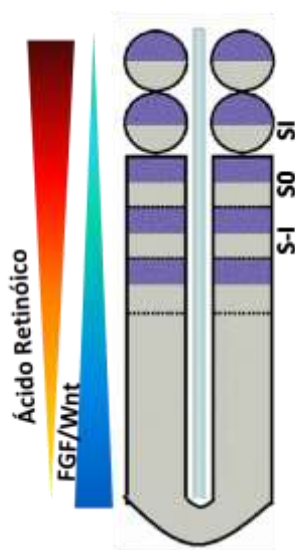


Fig. 3. Esquema representativo dos gradientes Wnt, FGF e ácido retinóico ao longo da MPS durante a formação dos sómitos. Wnt e FGF formam um gradiente que diminui no sentido caudo-rostral e o ácido retinóico diminui no sentido contrário.

1.6. Padronização rostro-caudal dos sómitos, a formação da fronteira e a epiteliação

O processo de segmentação envolve a padronização da MPS resultando no estabelecimento da polaridade rostro-caudal, seguida da individualização dos sómitos através da formação de fronteiras e a epiteliação das células superficiais (Tam et al. 2000). Este dinamismo das células começa a verificar-se ao nível da frente de determinação (Dubrulle et al. 2001) envolvendo alterações de expressão génica e de comportamento celular (Morimoto et al. 2005 ; Blonar et al. 1995; Martins et al. 2009) mais provavelmente em resposta a mudanças na concentração de FGF8 e ácido retinóico a esse nível.

A família de genes *Mesp* tem sido explorada como um possível participante na definição da fronteira e sómitos (Buchberger et al. 2002; Blonar et al. 1995). Portanto isto sugere uma ligação entre este e o relógio molecular da somitogénese e por outro lado um papel na transição da MPS não segmentada para um padrão segmentar (Blonar et al., 1995), seguindo um programa intrínseco da MPS (Buchberger et al. 2002). *Mesp2/Meso1* define a polaridade rostro-caudal dentro dos primórdios dos sómitos antes da especificação das fronteiras, onde participa por supressão da identidade rostral (Morimoto et al. 2006; Nomura-Kitabayashi et al. 2002). A manutenção da polaridade rostro-caudal é assegurada pela expressão de *Uncx4.1* e *Tbx18* (Oginuma et al. 2008) restritas à parte caudal e rostral respectivamente. Embriões em que gene o *Mesp2/Meso1* está ausente desenvolvem sómitos caudalizados (Takahashi et al. 2005), comprovados pela expressão do *Uncx4.1* em toda a MPS e *Tbx18* completamente ausente (Saga 2007). O padrão dinâmico de expressão de *Mesp2* está dependente da sinalização Notch e presença de *Tbx6* e é inibido pelo *Ripply2* que por sua vez é por ele activado (Dunty et al. 2008; Saga 2007; Oginuma et al. 2008).

1.7. As proteínas cinases da família Eph e os seus ligandos, os Ephrins

Depois do estabelecimento da polaridade rostro-caudal na MPS anterior, o *Mesp2/Meso1* está envolvido na activação de moléculas envolvidas na formação física da fronteira entre sómitos, nomeadamente as moléculas Eph e os seus ligandos os Ephrins (Watanabe 2009). Os Eph representam uma grande família de receptores tirosinas cinase transmembranares. Os seus ligandos, os Ephrins, estão acoplados à membrana celular por “glycosylphosphatidylinositol” (GPI). Os EphrinA geralmente ligam aos receptores EphA, enquanto que os EphrinB são transmembranares, com domínio intracelular e ligam por sua vez aos EphB. O receptor EphA4 liga a ambos os receptores. Para a efectivação da sinalização bidireccional ligando/receptor é exigida o contacto celular e resulta em

mudanças comportamentais da célula, mediada por componentes do citoesqueleto, sendo um destes comportamentos o de repulsão (Wada et al. 2003) .

Estudos em peixe zebra e em ratinho (Dottori et al. 1998) têm mostrado que a perturbação da sinalização entre os Eph/Ephrin ou o seu “*knockout*” resultam na formação aberrante de fronteiras entre sómitos. A interferência na sinalização Eph/Ephrin tanto em galinha, ratinho e peixe zebra é acompanhada de uma falha na transição epitélio-mesênquima, necessária para a formação do sómito, entretanto com o restabelecimento da sinalização, a transição, a epitelização e a formação morfológica das fronteiras são recuperadas (Barrios et al. 2003).

Apesar de vários receptores e ligandos estarem presentes durante a gastrulação e a organogénese, a EphA4 e EphrinB2 têm sido descritos como muito importantes na somitogénese. O padrão de expressão do EphA4 coincide com o início da gastrulação. Durante a segmentação é expressa na metade anterior da MPS na região do futuro sómito (S-I), onde a transcrição é elevada, mas diminui imediatamente a seguir a condensação dos sómitos. A manutenção da sua expressão neste domínio é assegurada pelo controlo do *Mesp2* (Nakajima et al. 2006). A ephrinB2 é expressa no compartimento posterior do sómito recém-formado (S0) e os níveis de RNAm para ephrinB2 diminuem depois da separação do sómito (Durbin et al. 1998). Pensa-se que a sinalização bidireccional da EphA4/ EphrinB2 permite a repulsão entre as células dos dois lados da fronteira somítica onde a expressão destas proteínas é elevada e, conjuntamente com o seu envolvimento na sinalização presente no processo de somitogénese possibilita a organização celular necessária para a individualização dos sómitos (Durbin et al. 1998).

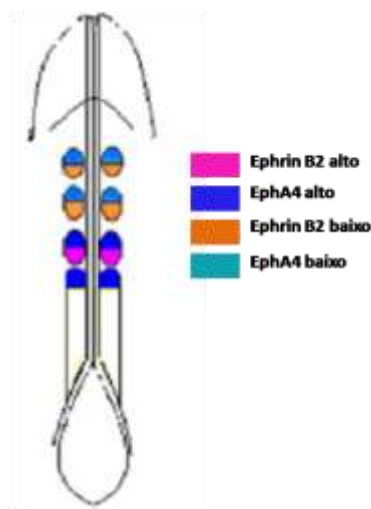


Fig.4. Diagrama esquemática de distribuição dos níveis de EphA4 e EphrinB2 durante a segmentação, baseados em experiências de hibridação *in-situ* (Baker et al., 2003) Adaptado de Glazier et al. 2008

1.8. A matriz extracelular na somitogénese: a fibronectina

A adesão celular, a migração celular, o crescimento celular, a diferenciação celular, a prevenção de apoptose e a formação de camadas epiteliais dependem da capacidade das matrizes extracelulares, que desempenham um papel tanto como de substratos para as células, como de indutores de sinalização envolvida em certos destinos celulares. Entre várias proteínas especializadas encontra-se a fibronectina (FN).

A FN é um dímero glicoproteico multifuncional composta de duas subunidades de ~250kDa unidas por pontes dissulfato, próximas às extremidades C-terminais (Pankov & Yamada, 2002). A ocorrência de diferentes formas, produtos de *splicing* alternativo, geram dois tipos de FN: a do plasma e a celular e ainda permite a geração de uma variedade de FNs que diferem na ligação com outros componentes extracelulares, permitindo a formação de matriz extracelular de propriedades diferentes, específicas para cada tecido (Pankov e Yamada 2002; Geiger et al. 2001). Através de vários domínios específicos na sua estrutura, são capazes de ligar a outras proteínas da MEC e a receptores de superfície celular, por exemplo às integrinas.

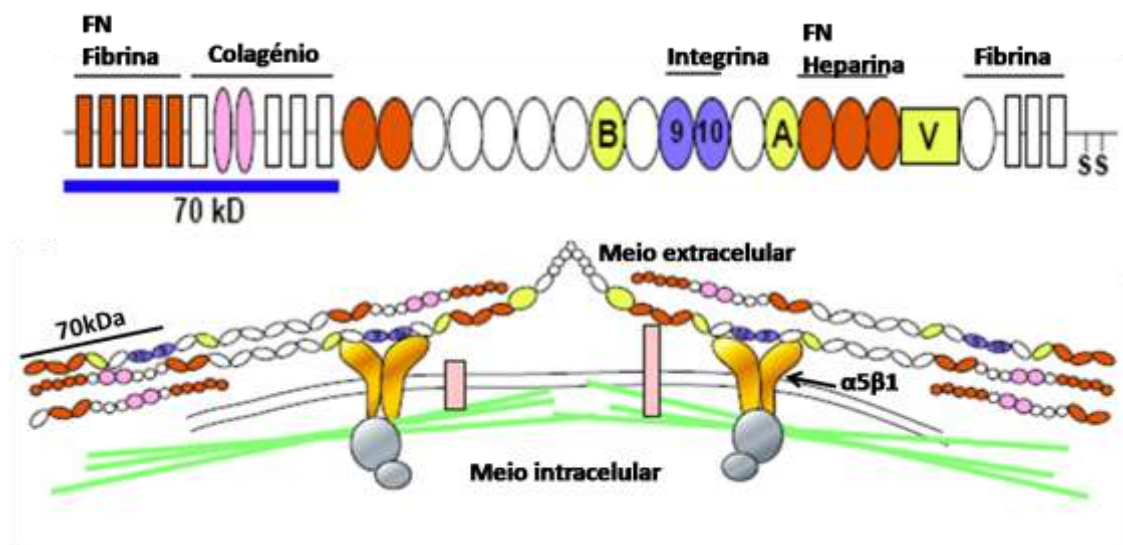


Fig. 5. Locais de ligação da FN a outras moléculas. Montagem da matriz de FN, através da interação FN-FN e FN-integrina. FN liga a integrina e outros receptores transmembranares, induz a reorganização da actina e activa a sinalização intracelular. O fragmento de 70 kDa (70 kDa) corresponde à região N-terminal da FN, envolvida na ligação FN-FN. Adaptado de Mao e Schwarzbauer 2005.

A montagem da matriz de FN envolve integrinas receptoras de FN, particularmente a $\alpha5\beta1$. A integrina $\alpha5\beta1$ é constituída pelas cadeias $\alpha5$ e $\beta1$ que em conjunto formam um domínio extracelular que se liga à FN pelo local RGD. Fora da célula a fibrilogénese envolve a ligação FN-FN através dos seus domínios N-terminal (Mao e Schwarzbauer 2005). A adição

do fragmento de FN de 70kDa e de anticorpos que bloqueiam o local RGD inibem a formação das fibrilhas (McDonald et al. 1987), o que mostra que interacção entre as integrinas e a FN e entre moléculas de FN são essenciais tanto para a iniciação da fibrilogénese como para a activação das redes de sinalização intracelular e para o estabelecimento da ligação entre a MEC e os componentes celulares. Conjuntamente com ligação FN-FN permitem uma estabilidade na MEC, essencial para controlar a rede de moléculas extracelulares e as vias de sinalização por eles modulados e envolvidos em vários comportamentos celulares (Sottile e Hocking 2002).

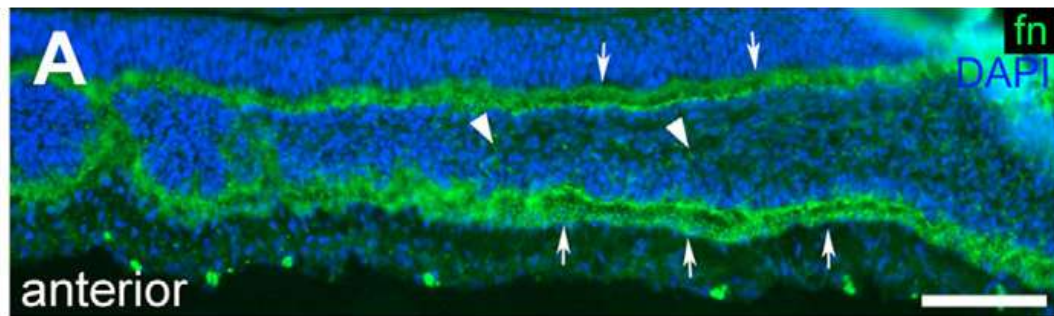


Fig.6.Distribuição de fibronectina na MPS e tecidos envolventes no embrião de galinha. Corte longitudinal revela presença fraca de FN dentro da MPS e forte envolvendo a MPS anterior (Rifes et al. 2007).

O conhecimento do envolvimento da FN na somitogénese é antigo (e.g. Lash et al. 1984; Lash e Yamada 1986). Estudos mais recentes mostram que a ausência da FN por destruição enzimática, a perturbação da sua actividade e a sua remoção genética tem efeitos graves na formação dos sómitos, tanto em embriões de galinha (Rifes et al. 2007; Martins et al. 2009), como de ratinho (Georges et al.1993; Georges-Labouesse et al. 1996; Yang et al. 1999) de *Xenopus* (Kragtorp e Miller 2007) e de peixe-zebra (Koshida et al. 2005; Jülich et al. 2005). Os efeitos mais severos foram vistos em embriões de ratinho onde a inactivação do gene para a FN (*Fn1*) resulta numa inibição total da somitogénese e, subsequentemente, em letalidade embrionária causada por múltiplos defeitos no desenvolvimento (George et al. 1993). Em peixe zebra foi demonstrada a importância da interacção entre a FN e a integrina $\alpha 5 \beta 1$, cuja mutação perturba a montagem da matriz de FN e a transição epitélio-mesênquima na MPS anterior (Koshida et al. 2005). A utilização de anticorpos contra a FN afecta principalmente a coesão celular em embrião de galinha (Duband e Thiery, 1987) e a inibição da fibrilogénese da FN perturba a epiteliação das células de MPS (Martins et al. 2009). Observações de Rifes et al. 2007 indicam ainda uma contribuição da ectoderme na produção da matriz da FN, que conjuntamente com os receptores da família das integrinas está envolvida na reorganização tecidual necessária para a formação do sómito (Lash et al. 1987; George et al. 1993; Correia e Conlon 2000; Rifes et al. 2007).

Sabe-se ainda que a alteração da matriz de FN parece acompanhar as alterações impostas pelo processo de segmentação, que de uma presença diminuta nas fases iniciais, aumenta em quantidade e complexidade na direcção rostral, ocupando a periferia dorsal e ventral da MPS e acaba por circunscrever os sómitos, à medida que estes se destacam da MPS (Duband et al. 1987). Isto demonstra a sua correlação com o mecanismo de compactação (Lash et al. 1984), adesão célula-célula e epiteliação (Duband et al. 1987; Rifes et al. 2007; Martins et al. 2009) e tem sido demonstrado que o efeito da FN na MPS e nos sómitos é mediado pelo receptor $\alpha 5\beta 1$ (Yang et al., 1999).

As MPSs isoladas dos tecidos circundantes, apesar de terem capacidade de segmentação molecular visível pela expressão segmentar de genes envolvidos na padronização rostro-caudal dos sómitos, não efectuam a transição mesênquima-epitélio na sua parte rostral e a formação de sómitos morfologicamente distintos não ocorre (Borycki et al. 2000, Packard, 1980; Palmeirim et al., 1998). Porém na presença da ectoderme, a transição mesênquima – epitélio e a formação de sómitos ocorre normalmente (Sosic et al. 1997; Palmeirim et al. 1998; Rifes et al. 2007).

Perante estas informações levanta-se algumas questões como: Será que a matriz da FN só intervém na segmentação morfológica ou influencia também a segmentação molecular? Se assim é, será que a FN produzida pela MPS é suficiente para suportar a segmentação molecular ou é preciso FN da ectoderme?

Apesar de estudos anteriores terem demonstrado que a FN é necessária para a formação de sómitos, não se sabe se há comunicação entre os efeitos da FN e as outras vias de sinalização envolvidas na somitogénese. Será o objectivo deste estudo manipular experimentalmente a FN para descobrir se tem também um papel como componente da sinalização que influencia a expressão de genes envolvidos na formação da fenda e na padronização rostro-caudal dos sómitos. Com a aplicação das técnicas de hibridação *in situ*, de imunofluorescência, de culturas *in vitro* de explantes e de MPSs isoladas, conjuntamente com a aplicação de protocolos experimentais e a constatação dos seus efeitos tornam-se possíveis a análise do padrão temporal de expressão dos genes envolvidos na segmentação e o estabelecimento de uma possível correlação com a presença ou não de uma matriz de FN.

1.9. Objectivos:

Propomos como objectivos para este trabalho o seguinte: (1) confirmar o padrão genético de segmentação molecular em MPSs isoladas, (2) verificar os efeitos da inibição da fibrilogénese da FN na segmentação molecular em explantes e em MPSs, (3) correlacionar esses eventuais efeitos com o efeito da perturbação da via Notch em explantes, (4) verificar se as eventuais falhas da somitogénese verificadas em 2 e 3 estão relacionadas com o desaparecimento da expressão de *Meso1* e por último (5) verificar se a segmentação molecular é um processo intrínseco da MPS ou se depende de FN exógena.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção de embriões

Os embriões foram obtidos de ovos de galinha (*Gallus gallus*) fertilizados, adquiridos comercialmente na empresa Avipronto. Estes foram mantidos a 13°C até o início do processamento experimental. Foram incubados a uma atmosfera húmida de 38° C, de forma a obter embriões de estádios representativos entre HH10-HH14, segundo Hamburger e Hamilton (1992). Os embriões foram recolhidos em “*phosphate buffered saline*” (PBS1X) e fixados imediatamente ou, quando utilizados para culturas de explantes, os embriões foram recolhidos em PBS com Ca^{2+} e Mg^{2+} (suplementado com 0,18% de CaCl_2 e 0,1% de MgCl_2 ambos a 0,5M). Quando os embriões foram utilizados para cultura, os ovos foram previamente desinfetados com etanol a 70% de forma a manter o mais possível a esterilidade e diminuir o risco de contaminações.

2.2. Preparação do meio de cultura

O meio de cultura, denominado 10:1 é composto por meio 199 (M199)+GlutaMAX™ (Invitrogen; ref: 41150-020), suplementado com 10% de soro de galinha (Invitrogen; ref: 16110-082), 5% de soro fetal bovino (FBS) (Invitrogen ; ref: 16140-071) e 1% penicilina/estreptomicina (Invitrogen; ref: 15070-063). O meio denominado 8:1 teve como base o mesmo meio M199+GlutaMAX™ tendo sido suplementado com 12,5% de soro de galinha, 6,25% de FBS e 1,25% penicilina/estreptomicina.

2.2.1. Remoção ou redução da FN do soro

Para remover ou reduzir a quantidade de FN (presente no soro de galinha e FBS) do meio de cultura, foi utilizada a técnica de adsorção da FN pela gelatina. Para esse efeito, em cada um de três frascos de cultura de células de 75cm² foi colocado 10ml de solução de gelatina 1% (gelatina de pele de porco tipo A; G2500- Sigma-Aldrich) e deixado a depositar à temperatura ambiente, durante pelo menos 4 horas. O excesso de solução de gelatina de um dos frascos foi aspirado cuidadosamente, a partir de um dos cantos, e sobre o fundo revestido por gelatina foi colocado 10ml de meio de cultura (10:1), previamente preparado como descrito em 2.2. Entretanto 10ml foram adicionados a um frasco sem gelatina para servir de controlo. Após 14 horas no frasco 1, o meio de cultura foi novamente transferido para um novo T75 pré-coberto com gelatina, até totalizar 3 passagens. Esta repetição foi feita para maximizar o processo de absorção da FN do meio à gelatina.

2.3. Micromanipulações cirúrgicas

Após a desinfecção dos ovos, os embriões recolhidos em PBS completo foram lavados e transferidos para caixas de Petri com fundo negro preparado para melhorar a visualização dos embriões. Estes foram colocados com a parte dorsal voltada para baixo e presos com o auxílio de agulhas de tungsténio de modo a facilitar a manipulação, que passou pelo isolamento dos explantes e da MPS.

2.3.1. Isolamento e cultura de explantes *in vitro*

Nos embriões recolhidos foram feitos cortes longitudinais a meio do tubo neural (TN), separando as duas metades posteriores do embrião. Cortes transversais na fronteira anterior ao 4º sómito formado (designado SIV segundo Christ e Ordahl, 1995) permitiram isolar a MPS da parte anterior do embrião. Os explantes foram completamente isolados com cortes transversais no Nó de Hensen e laterais à MPS, de modo a que de cada embrião fossem utilizados dois explantes iguais (esquerdo e direito) que pudessem ser comparáveis, formados por uma MPS e os quatro sómitos mais recentes.

De seguida os dois explantes foram cultivados sobre um filtro de polycarbonato Millipore de 0,8µm (ref. ATTPo2500, IsoporeTM), que se mantiveram durante a cultura sobre o meio (10:1), permitindo trocas gasosas e de nutrientes, em placas de 4 poços (delta nunc 176742). Nestas condições a somitogénese prossegue normalmente e em 6 horas são formados quatro novos sómitos (Palmeirim et al. 1997).

2.3.1.1. Inibição de fibrilogénese pelo fragmento N-terminal de fibronectina de 70KDa

Para testar o efeito da inibição da fibrilogénese da fibronectina na segmentação molecular, os explantes controlo foram cultivados em meio contendo albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) a 100µg/ml e os experimentais em meio condicionado com o fragmento 70KDa (Sigma-Aldrich ; F0287) a 100µg/ml durante 6 horas.

2.3.1.2. Inibição da sinalização Notch por DAPT

Ao meio de cultura foi adicionado 0,4% de inibidor da γ -secretase IX (DAPT; 565784, Calbiochem) a 25µM, ou dimetilsulfóxido como controlo (DMSO; D2650; Sigma) (Gibb, 2009). As culturas foram mantidas durante 3; 4,5; 4,75 e 6 horas.

2.3.2. Isolamento e cultura de MPSs *in vitro*

As MPSs foram isoladas dos embriões através da combinação da micromanipulação e da acção enzimática da pancreatina, que digere a MEC facilitando o isolamento da MPS dos tecidos circundantes. Primeiramente, com uma agulha de tungsténio bem afiada, foram efectuadas incisões superficiais, atingindo apenas a endoderme com o objectivo de rasgá-la lateralmente aos sómitos a uma distância de 2 a 4 sómitos do TN, alongando do SII até o Nó de Hensen. A pancreatina 4x (Sigma) foi gotejada sobre esta zona e, após 3 minutos de acção foi inibida com FBS. Como auxílio de uma agulha de tungsténio, a endoderme entre as incisões foi descolada e assim a MPS praticamente solta da ectoderme foi cuidadosamente isolada e recolhida com uma pipeta, cuja ponta foi adaptada com a extremidade da pipeta de Pasteur de vidro ligeiramente boleada. Estas MPS isoladas foram cultivadas em meio 10:1 durante 6 horas, conforme descrito no ponto 2 acima.

2.3.2.1. Ensaio de inibição pelo fragmento 70kDa

As MPS isoladas foram cultivadas durante 6 horas em meio de cultura cuja composição foi descrita em 2.1.2 e também condicionado com 100, 50, 25 ou 10 µg/ml do fragmento 70kDa nas culturas da metade experimental e com BSA á mesma concentração nas MPSs controlo.

Todas as manipulações foram efectuadas no interior da câmara de fluxo laminar, garantindo assim a esterilidade das culturas. Os explantes em cultura foram mantidos numa incubadora com humidade saturada a 37°C e 5% de CO₂.

2.4. Hibridação *in situ*

Os embriões não cultivados e os explantes e as MPS isolados, após cultura foram fixados em 4% formaldeído em PBS completo (com Ca²⁺ e Mg²⁺) contendo EGTA a 2 mM, de um dia para o outro a 4°C. No dia seguinte foram lavados em Tween 20 a 0,1% em PBS sendo posteriormente desidratados numa série crescente de metanol e guardados a -20°C, caso a técnica não fosse prosseguida no mesmo dia. No primeiro dia da hibridação *in situ*, foram rehidratados numa série decrescente de metanol e preparados para receber as sondas, segundo o procedimento padrão para a hibridação *in situ* (Henrique *et al.* 1995), optimizado para as MPS (Palmeirim *et al.* 1997). Devido às suas fragilidades, o tempo de actuação da proteinase K (Roche) foi reduzido a 2,5min. As sondas cDelta1 e cMeso1 marcadas com digoxigenina foram colocadas a hibridar com os embriões, explantes ou MPS durante a noite a 70°C e seguidamente as lavagens pós-hibridação foram efectuadas à mesma temperatura.

A sonda ligada ao RNAm alvo foi detectada com o anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (Roche) e a actividade da fosfatase alcalina foi visualizada com uma revelação em 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT; Roche). Os embriões e os explantes foram fotografados em PBT ("phosphate buffered saline" com 0,1% Triton X-100 (Sigma)) com 0,1% azida.

2.5. Imunofluorescência

Para a visualização de fibronectina e do núcleo das células, as MPS foram fixadas durante pelo menos 12 horas em PFA 4% (4% de paraformaldeído em 0.1M PBS (pH 7.4)) a 4°C e lavadas 3 x 10min em PBS 1x para uma remoção completa do fixador. Estas foram depois submetidas à preparação de permeabilização de uma hora em ID (1 % BSA e 1 % Triton X-100 em PBS 1X) à temperatura ambiente para de seguida ser adicionado o anticorpo Anti-Human Fibronectin (F-3648, Sigma) diluído a 1/100 em ID, que foi mantido durante a noite a 4°C. A seguir procedeu-se às lavagens (3 x 10 minutos sob leve agitação com PBS 1x). Depois fez-se uma nova incubação com o anticorpo secundário Alexa 488 anti-rabbit IgG F(ab')₂ (A-11070, Molecular Probes), conjuntamente com TO-PRO3 diluído a 1/1000 (T3605, Molecular Probes), para a marcação nuclear, e RNase a 1/100 em ID para reduzir a marcação inespecífica de ácidos nucleicos, durante a noite em escuro a 4° C. Após 30 minutos de lavagens em PBS 4x e 3 x 10 minutos em PBS 1x procedeu-se à montagem em lâminas.

Finalmente, sobre uma lamela previamente preparada com PLL (Poli-L-lisina; Sigma-Aldrich) que promove a aderência das MPS ao vidro, e fazendo uso do meio de *N*-propil-galacto que reduz a fotolixiviação durante a observação ao microscópio de fluorescência, a lamela foi vertida sobre a lâmina e selada com verniz.

2.6. Obtenção e análise de imagens

Após a fixação, os explantes foram primeiramente observados e os sómitos contados com a lupa Nikon SMZ-645 Stereo Zoom Microscope, para o estabelecimento da diferença morfológica entre os explantes. Para a detecção dos RNAm dos genes em estudo, os explantes e as MPS foram fotografados após a hibridação *in situ*, utilizando uma câmara (Olympus C-4040 Zoom) acoplada a uma lupa (Wild Heerbrugg M2). No caso das imunofluorescências, as MPS foram observadas e fotografadas através do microscópio confocal (Leica SPE) com a lente 40x 1.3NA. As imagens de explantes processados para hibridação *in situ* foram gravadas em formato JPEG e editadas no programa Photoshop.

As imagens obtidas no microscópio confocal foram gravadas em formato TIFF e processadas e analisadas usando o software ImageJ. Para obter uma estimativa da quantidade de fibronectina presente nas MPS, primeiro fez-se uma projecção “z” da intensidade máxima de todas as fatias ópticas e na imagem obtida foram medidas o somatório dos níveis de cinzento em áreas equivalentes da porção anterior de cada par de explantes (experimental vs. controlo). A análise restringiu-se à porção anterior da MPS pois em alguns casos verificou-se a perda da porção posterior durante o seu isolamento. De forma a garantir que as medições eram comparáveis, medimos primeiro a área da porção “mais bem preservada” e depois uma área igual no explante par. Desta forma pudemos comparar a quantidade de fibronectina produzida e depositada em pares de explantes tratados em condições diferentes.

2.7. A análise estatística

A comparação do número de sómitos e de banda delta1 formados pelos explantes cultivados em condições diferentes foi feita com a aplicação do Student's t-test, depois de assegurar que os pressupostos eram verificados. Os dados que não respondiam ao pressuposto de normalidade, foram transformados usando a potenciação ou a raiz quadrada (discriminados na secção dos resultados). Depois de testadas a homogeneidade e a homocidasticidade dos dados transformados, foi aplicado o t-test para variáveis dependentes. Os dados que mesmo depois de transformados não respondiam ao pressuposto de normalidade foram analisados com a aplicação do teste não paramétrico para duas variáveis dependentes. Todas as análises foram efectuadas no programa STATISTICA 8 (StatSoft) com 95% de intervalo de confiança.

Resultados

Para determinar qual o papel da fibronectina na segmentação molecular no embrião de galinha foram utilizados embriões de galinha inteiros, explantes de partes posteriores e MPS. Foi comparada a segmentação molecular em condições normais (com presença da matriz de FN intacta) e em condições de perturbação da montagem das moléculas de FN numa matriz complexa (Rifes et al. 2007; McKeown-Longo e Mosher, 1985), ao perturbar a via de sinalização Notch e em meio com quantidades reduzidas de FN.

3.1. O programa genético de segmentação molecular em MPSs isoladas ocorre normalmente.

Estudos anteriores têm demonstrado que a segmentação molecular (visualizada através do aparecimento progressivo de bandas de expressão de *delta1*) ocorre normalmente em MPSs isoladas apesar destas não formarem sómitos (Palmeirim et al. 1998). A nossa primeira abordagem passou por repetir estas experiências, em que foram isolados explantes simétricos de MPSs de embriões nos estádios HH10-HH14, cultivados durante 6 horas (n=6) em meio de cultura sem nenhum condicionante. Para descartar a hipótese da recolha de MPSs estar a alterar a expressão deste gene, recolheram-se embriões nos mesmos estádios (n=14), que foram imediatamente fixados e submetidos a hibridação *in situ*, para *delta1*.

Não se observa nenhuma diferença no padrão de expressão do marcador da segmentação molecular *delta1* nas MPS isoladas e nos embriões inteiros (Fig. 7A,B). A hibridação *in situ* em embriões nos estádios HH10-HH14, revela que *delta1* está fortemente expresso na MPS (excepto na sua parte mais rostral) e na região caudal dos sómitos formados (n=10; Fig.7A). Igualmente, em MPS isoladas e cultivadas durante 6 horas, apesar de não se formarem sómitos morfológicamente distintos (Palmeirim et al. 1998), o padrão de expressão de *delta1* é idêntico ao padrão no embrião: há uma forte expressão na MPS e na parte rostral evidenciam-se 4 bandas sucessivas (n=5; Fig.7B), que é indicativo de segmentação molecular (Palmeirim et al. 1998). Esta observação confirma que MPSs isoladas dos tecidos adjacentes com pancreatina e cultivadas durante 6 horas expressam 4 bandas de *delta1* consistente com a especificação de 4 sómitos, apesar desses sómitos não se formarem morfológicamente.

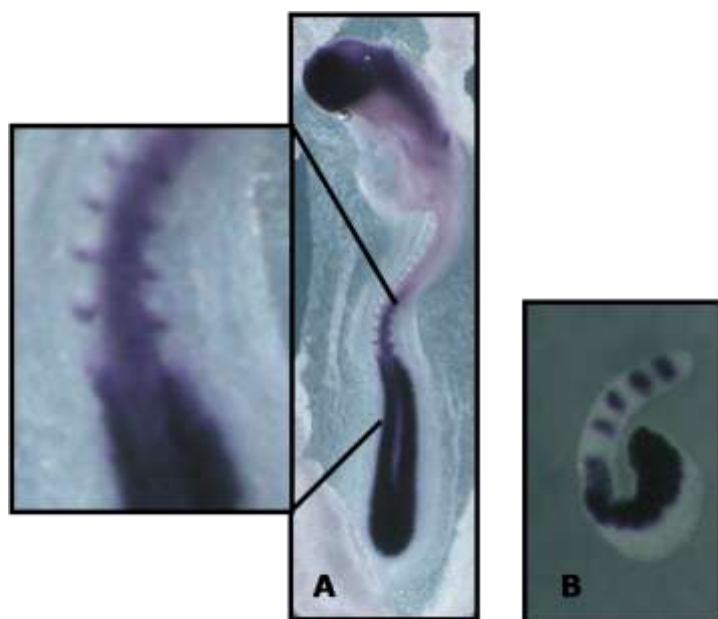


Fig.7. Hibridação *in situ* de embrião inteiro com 13 a 22 sómitos e de MPS isoladas com sonda RNAm contra *delta1*, mostra o padrão de expressão de *delta1* na MPS e metade caudal dos sómitos no embrião (A). Na MPS isolada e cultivada durante 6 horas verifica-se a presença de 4 bandas de expressão de *delta1* na região rostral do explante e uma expressão forte e contínua na parte caudal do mesmo (B).

3.2. A segmentação molecular em explantes cultivados com o fragmento de 70kDa não ocorre normalmente.

Para perceber os efeitos da inibição da fibrillogénese da matriz da FN na segmentação molecular, foram isolados da metade posterior de embriões de galinha explantes simetricamente iguais (cada um incluindo a MPS, os 4 sómitos mais recentes e todos os tecidos circundantes) e esses explantes foram cultivados durante 6 horas, sendo um lado (experimental) em meio de cultura com 100 µg/ml do fragmento 70kDa da FN e o outro lado (controlo) em meio com 100 µg/ml BSA. Fez-se, de seguida, a análise do efeito do fragmento ao nível da segmentação molecular por dois parâmetros: hibridação *in situ* para *delta1* e para *meso1*.

Os resultados da hibridação *in situ* para *delta1* (n=8 pares) evidenciaram que os controlos, cultivados na presença de BSA, apresentaram 7-8 bandas (4 bandas presentes antes da cultura e uma média de 3,4 bandas novas; Fig. 8A), ao passo que na presença do fragmento de 70kDa os explantes apresentam geralmente 6 bandas (as 4 bandas presentes antes da cultura e uma média de 1,9 bandas novas; Fig. 8A'). Portanto estes resultados revelaram a capacidade de formação de 3 a 4 bandas de expressão *delta1* e 3 a 4 sómitos nos controlos, coincidente com a segmentação *in vivo*, enquanto nos explantes cuja fibrillogénese de FN foi inibida através da acção do fragmento 70kDa só se formaram 1 a 2 bandas *delta1* e 1 a 2 sómitos.

A comparação do resultado da hibridação *in situ* com sonda RNAm para *Meso1*, em explantes condicionados pelo fragmento e os cultivados em BSA, evidenciou uma variação no padrão de expressão de *meso1* (n=6 pares). Este gene que normalmente é expresso

simetricamente na região mais anterior das duas MPS, revela uma assimetria na expressão quando se compara as metades experimental e controlo, localizando-se num domínio de expressão mais rostral nos controlos (n=6 pares; Fig. 8B) do que nos experimentais onde se situa mais caudalmente (Fig. 8B').

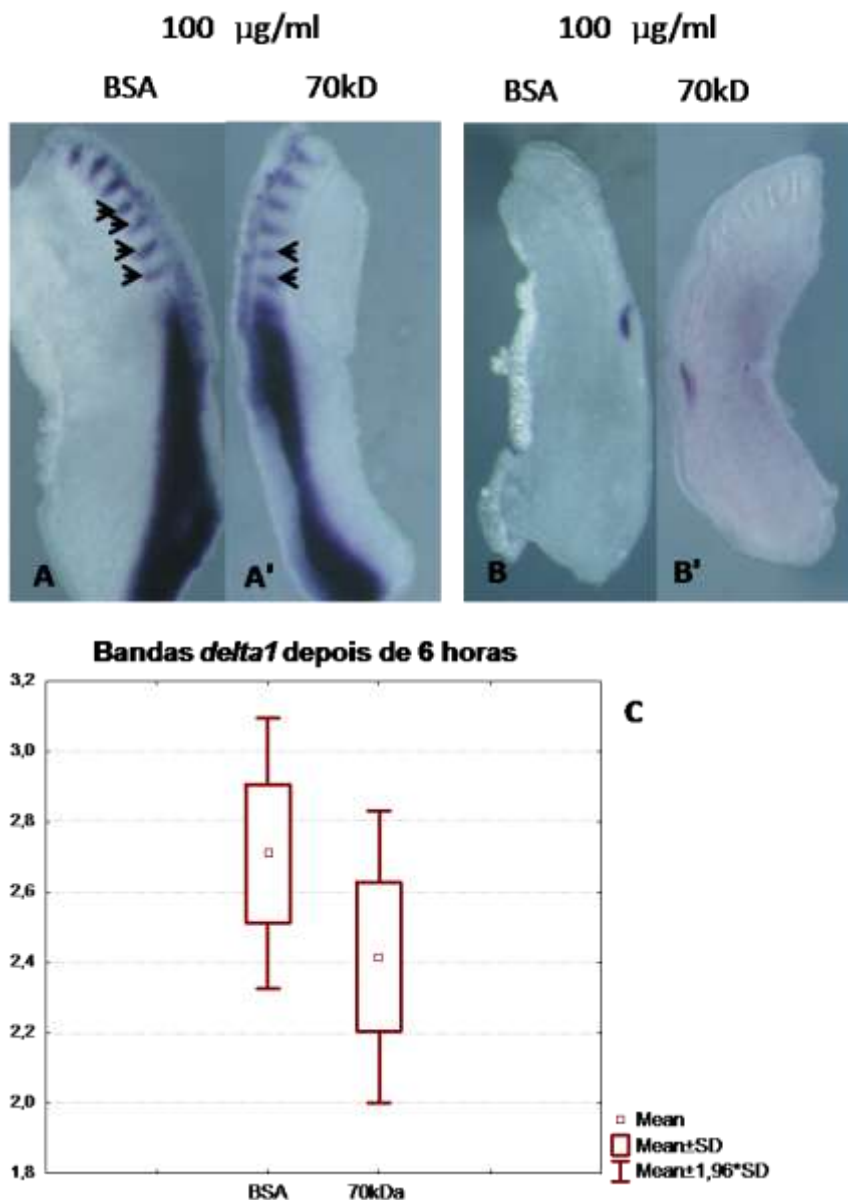


Fig. 8. Pares de explantes representativos das culturas de 6 horas com o fragmento de 70kDa e BSA, processadas por hibridação *in situ* para *delta1* (A) e *meso1* (B). Explantes com 4 sómitos iniciais cultivados com BSA formam mais 3-4 sómitos e mais 3-4 bandas de expressão de *delta1* (A), enquanto que os cultivados com o fragmento de 70kDa a 100 µg/ml formam mais 2 sómitos e 1,9 bandas de *delta1* (A'). A expressão de *meso1* varia em explantes cultivados com o 70kDa (B') em relação ao controlo (B). C. Representação gráfica da média das bandas *delta1* presentes em explantes cultivados com BSA e 70kDa durante 6 horas (dados transformados por raiz quadrada e os valores médios comparados por *t-test* para variáveis dependentes). As barras representam o desvio padrão dos valores médios. O nº de bandas formadas nos explantes cultivados na presença do fragmento é inferior às formadas nos controlos. Esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

3.3. A segmentação molecular em MPS impedidas de montar matriz com a FN do soro não ocorre normalmente.

Uma vez demonstrada a importância da FN na segmentação, isto é, que a inibição da fibrilogénese de FN pelo fragmento de 70kDa interfere no padrão normal de segmentação molecular, resolveu-se averiguar como é que esta perturbação ocorre.

Para isso, MPSs foram isoladas dos tecidos vizinhos com recurso a pancreatina, uma enzima que destrói toda matriz de FN (Rifes et al., 2007) e cultivadas durante 6 horas com o fragmento de 70kDa a 100 µg/ml. Foi observado que, depois do tempo de cultura, as MPSs desfizeram-se completamente, não permitindo o seu processamento para hibridação *in situ*. Reduziu-se, então, a concentração para 50 µg/ml e verificou-se que, depois de 6 horas, algumas MPSs ficaram totalmente desfeitas ao passo que outras, embora inteiras, apresentavam um aspecto muito fragilizado que não suportaria uma hibridação *in situ*. Depois de optimizada a concentração do fragmento de 70kDa para 25 µg/ml foi possível verificar, através da hibridação *in situ*, a formação de 2 (n=3; Fig. 9B) e por vezes 3 bandas (n=2; Fig. 9C) de expressão de *delta 1*, enquanto que nas MPSs controlo, cultivadas com BSA, evidenciaram 4 bandas (n=4 pares; Fig. 9D).

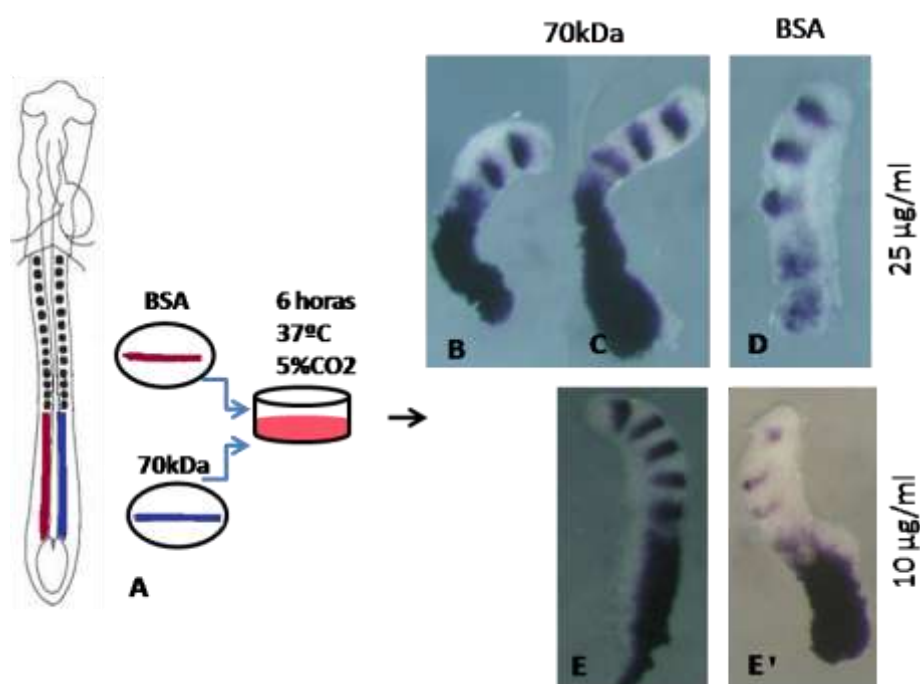


Fig. 9. A segmentação molecular é perturbada quando os explantes de MPS são cultivados com o fragmento de 70kDa (A-E'). Pares de MPSs foram isoladas e cultivadas em meio com BSA ou com o fragmento de 70kDa, durante 6 horas a 37°C e 5% de CO₂ (A); Hibridação *in situ* para RNAm para *delta 1* revela 2 ou 3 bandas nas culturas com o

fragmento a 25 µg/ml (B e C) e 4 bandas nas metades cultivadas com BSA (D); MPS cultivada com o fragmento de 70kDa a 10 µg/ml forma 4 ou 5 bandas (E) tal como o controlo cultivado com BSA (E')

À medida que se diminuiu a concentração do fragmento, a integridade das MPSs melhorava. Daí foi experimentado a concentração de 10 µg/ml e o resultado foi o surgimento de 4 a 5 bandas de expressão de *delta 1* (Fig. 9E), igualmente às previstas para o controlo (n=2 pares; Fig. 9E'). Portanto esta concentração revelou-se insuficiente para perturbar a expressão de *delta 1*. Concluiu-se assim que existe uma correlação entre a dosagem do fragmento de 70 kDa e o grau de perturbação de expressão de *delta1* em MPSs isoladas e cultivadas durante 6 horas.

3.4. Correlação entre o efeito da inibição da fibrillogénese de FN e o efeito de inibição de Notch

Sabendo que a segmentação molecular é dependente da sinalização Notch e, como já foi constatado neste trabalho, também é dependente da matriz de FN, pretendeu-se verificar se a perturbação da segmentação molecular causada pela inibição da montagem da matriz de FN é semelhante ao efeito causado pela inibição de Notch. Procedeu-se então, à realização de culturas de pares de explantes: de um lado na presença de um inibidor de Notch (DAPT) e do outro lado controlo na presença de DMSO, durante 6 horas.

Os resultados foram avaliados através de evidências morfológicas e moleculares depois da cultura. Ao nível morfológico foram comparados o número total de sómitos dos experimentais e dos controlos. Os controlos (n=30) formaram em média 3,4 sómitos enquanto os experimentais formavam 1,6 sómitos (n=30 pares). Consequentemente, a diferença observada entre cada par (controlo/experimental) de explante foi em média de 1,8 sómitos (Fig. 10).

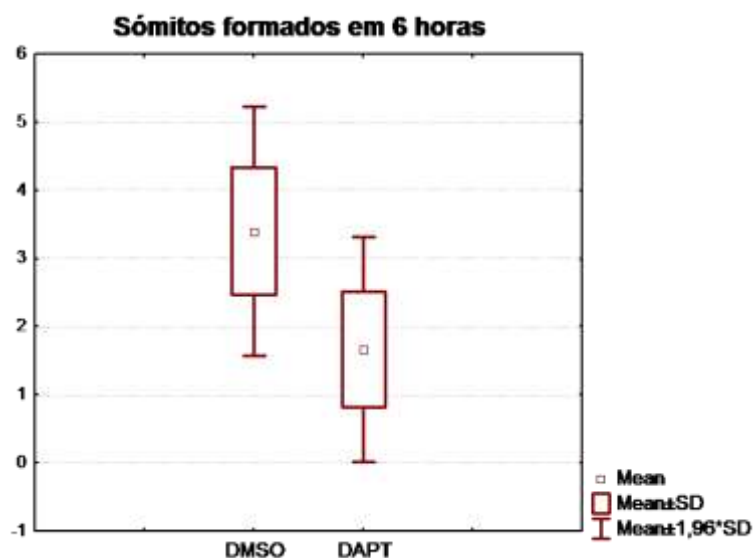
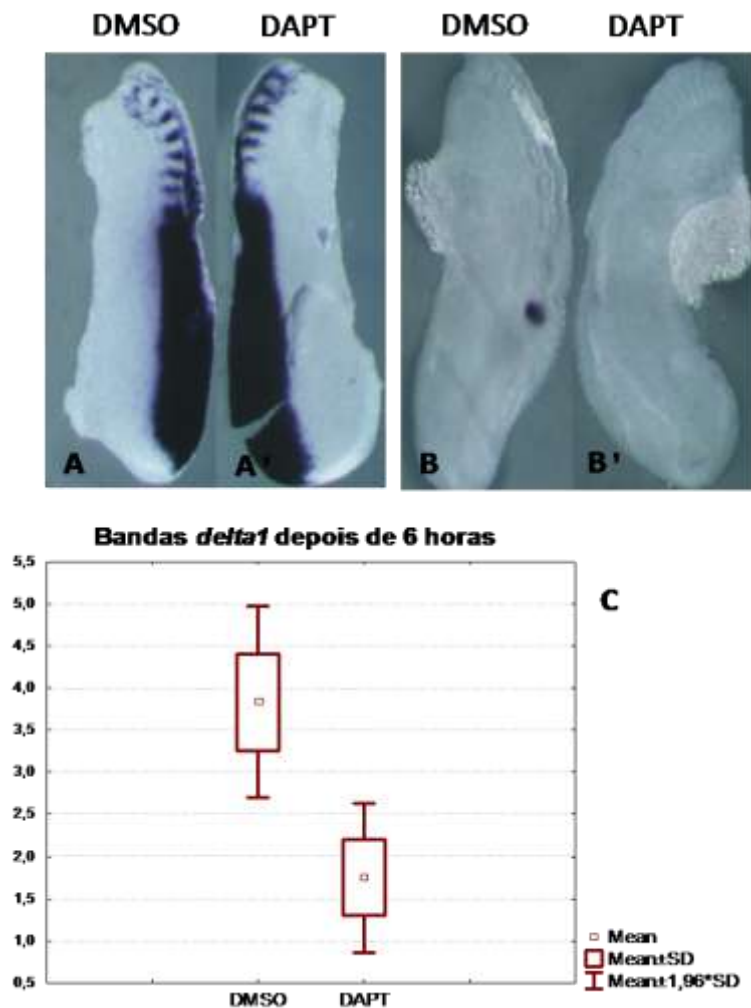


Fig. 10. Representação gráfica dos resultados da comparação morfológica dos explantes control (DMSO) e os incubados com DAPT. Análise não paramétrica dos dados. As barras representam o desvio padrão dos valores médios. Explantes cultivados com DMSO apresentam uma média de 3,4 sómitos formados, enquanto que os cultivados com DAPT apenas formam em média 1,6 sómitos. Esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

No respeitante à segmentação molecular, comparou-se explantes cultivados com DMSO e explantes cultivados com DAPT, através da hibridação *in situ* para RNAm de *delta1* e de *meso1*. Constatou-se que durante as 6 horas de cultura, formaram-se uma média de 3,8 bandas de expressão de *delta1* nos controlos (n=14 pares; Fig. 11A,C) e 1,7 nos explantes cultivados com DAPT (n=14 pares; Fig. 11A',C). Portanto, os explantes experimentais revelaram em média menos duas bandas de hibridação para o gene *delta1* do que os controlos (n=14 pares) que representa uma diferença significativa (Fig. 11C). Este resultado indica que a inibição de Notch resulta numa perturbação da capacidade de segmentação molecular da MPS.

A hibridação *in situ* revelou presença de *meso1* na MPS dos explantes controlos (Fig. 11B) e ausência de expressão na dos explantes experimentais (n=6 pares; Fig. 11B') depois de 6 horas de cultura. Portanto a expressão de *meso1* descrita por vários autores (Buchberger et al. 2002) deixou de existir com a inibição de Notch durante 6 horas.



No conjunto, estes resultados apontam para uma semelhança entre os efeitos da inibição de fibrillogénese de FN e o da inibição de Notch, na segmentação molecular, embora a ausência da FN não implique uma *downregulation* de *meso 1*, mas apenas uma certa desregulação.

Entretanto levantou-se a questão se a inibição de Notch pelo DAPT é imediata, desregulando/perturbando o relógio molecular e, consequentemente, a segmentação molecular e a somitogénese ou se só se verifica depois do tempo de formação dos dois pares de sómitos que se formam nesses explantes?

Para responder à esta questão foi-se verificar o efeito de DAPT em explantes cultivados durante apenas 3 horas, pelo mesmo procedimento descrito no ponto anterior. As evidências morfológicas apontaram para uma igualdade no número de sómitos formados nos explantes tratados com o DAPT e os controlos, em média 1,34. Porém a hibridação *in situ* para *delta 1* revelou que 1/3 dos explantes apresentaram uma banda de expressão de *delta1* a menos do que os experimentais (n=12 pares; Fig. 12B). Nos controlos formaram-se em média 1,7 bandas e nos experimentais 1,4. No conjunto, na presença de DAPT formam-se em média 0,3 bandas *delta1* a menos do que os controlos, o que representa uma diferença significativa (p=0,038; Fig. 12C). Este resultado demonstra que o efeito do DAPT é manifestado em forma de um atraso na segmentação já visível às 3 horas de cultura. Este atraso torna-se mais evidente depois de 6 horas onde os explantes cultivados com DAPT formam menos 2 bandas *delta1* do que os controlos (p=0,0014; ver Figura 11C).

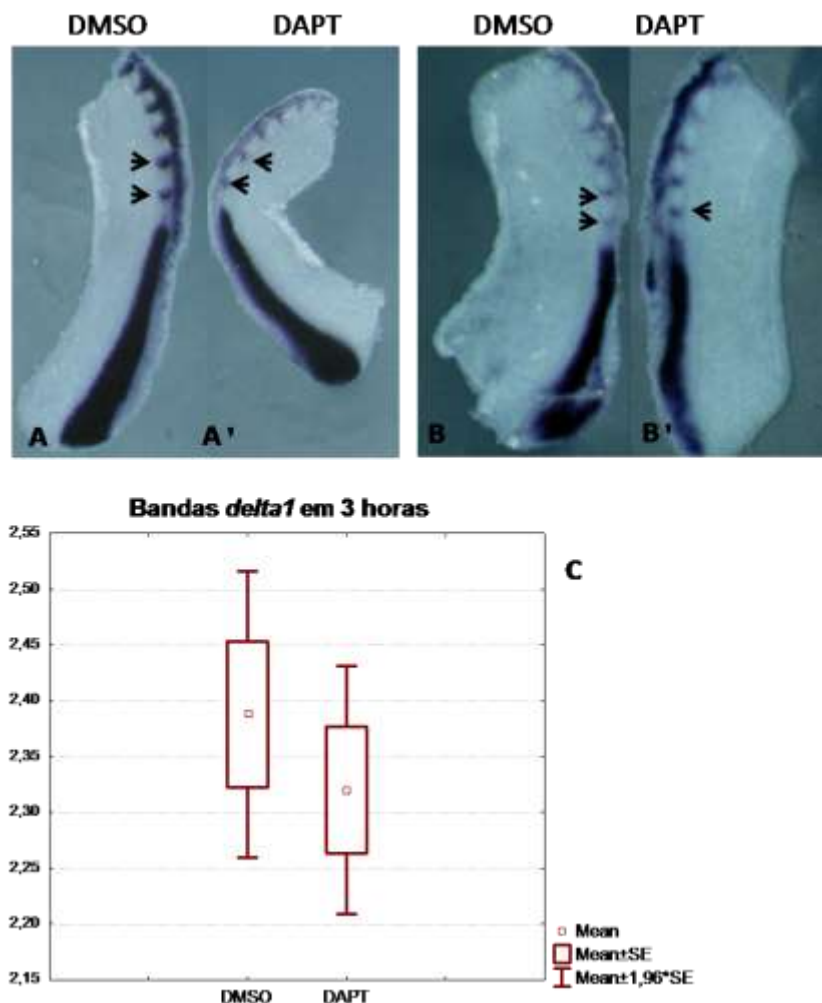


Fig. 12. Comparação do número de bandas de expressão de *delta1*, formados em 3 horas de cultura, de pares representativos de explantes (A e B). Na maioria (2/3) dos explantes formam-se duas bandas em ambas as metades (A e A'), mas em 1/3 dos explantes forma-se menos uma banda nos experimentais (B e B'). (C) Quantificação do número de bandas de expressão de *delta1* formados em 3 horas de culturas (dados transformados por raiz quadrada) mostram que se formam menos bandas nos explantes cultivados com DAPT do que nos controlos ($p < 0,038$).

3.5. A falha na sómitogénese está correlacionada com o desaparecimento de *meso1*.

Para verificar se a falha na somitogénese provocada pela inibição de Notch está relacionada com o desaparecimento de expressão de *meso1*, procedeu-se à seguinte experiência:

Cultivou-se pares de explantes (controlo) com DMSO em que as duas metades foram recolhidas e fixadas em momentos diferentes. A metade esquerda foi fixada enquanto a direita permaneceu em cultura por mais 1 ou 1,5 horas. De seguida, por hibridação *in situ*, foi verificada a variação da expressão de *meso1* no intervalo temporal entre a fixação das duas metades (entre 2 a 3 horas, entre 3 a 4,5 e entre 4,75 a 5,75).

Foi constatado que, nos controles, a expressão de *meso 1* variou de igual modo nos pares de explantes A A' e B B' e todos os explantes exibiam um sinal positivo para *meso1* pelo menos até as 6 horas de culturas realizadas (dados não mostrados), apresentando a sua ritimicidade normal de expressão (n=4 pares; Fig. 11A A', B B', C C'). Uma ligeira diferença é vista no 1º par cultivado com DMSO, onde *meso 1* aparece muito fraco às 3 horas (Fig. 13A A').

O mesmo intervalo temporal foi utilizado para as culturas com DAPT. Uma metade foi fixada enquanto a outra permanecia por mais tempo em cultura. De seguida, por hibridação *in situ*, foi verificada a variação da expressão de *meso1* no intervalo temporal entre a fixação das duas metades. A variação do padrão de expressão do gene entre os pares D D' (n=4 pares; Fig. 13D D') é semelhante ao de E E' (n=4 pares; Fig. 11 E E'), desaparecendo às 4,5 horas, mas a sua ritimicidade normal de expressão foi mantida até o seu desaparecimento (4,5 horas; Fig. 13F F').

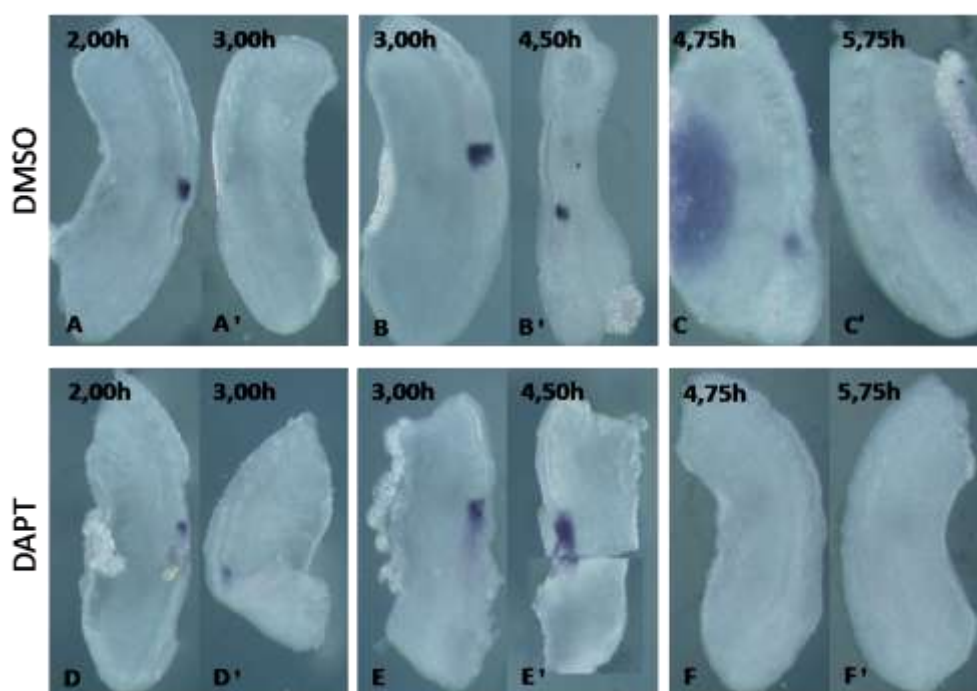


Fig. 13. Variação de RNAm de *Meso1* em pares de explantes cultivados com DMSO (A-C) e com DAPT (D-F) Os explantes foram fixados imediatamente ao completar o tempo de cultura marcado nas fotografias. No 1º par de culturas com DMSO *meso1* é expresso na PSM a 2 horas de culturas (A) é fraco no par direito a 3 horas (A'); no 2º par está presente a 3 horas, no par esquerdo (B) e mais posteriormente a 4,5 horas no par direito (B'); e também às 4,75 (C). Nas culturas com DAPT, no 1º par a 2 horas de cultura *meso1* é expresso (D) e também a 3 horas (D'); No 2º par *meso 1* é expresso nas duas metades (E E'). Depois de 4 horas e 45 minutos de cultura a expressão de *meso 1* está ausente (F F');

Portanto, a inibição de Notch perturba a expressão de *meso1* apenas depois de completar três ciclos de expressão, desaparecendo imediatamente a seguir.

3.6. A segmentação molecular é uma propriedade intrínseca das MPSs ou depende de uma matriz de FN?

Para investigar se a FN presente em forma solúvel no soro do meio de cultura participa na regulação da segmentação molecular da MPS, cultivou-se MPSs isoladas com pancreatina, em meio normal (com FN) e em meio que tinha sido tratado de forma a reduzir a quantidade de FN presente. Procedeu-se à diminuição da FN existente no soro, através da incubação do meio de cultura em substratos de gelatina. De seguida cultivou-se por um lado, explantes de MPSs (esquerda) neste meio e por outro lado os controlos (direita) em meio normal contendo soro com FN. Sobre estas MPSs foram aplicadas as técnicas de hibridação *in situ* e de imunofluorescência para verificar, através da expressão de RNAm de *delta 1*, os efeitos da ausência de FN na segmentação molecular e, para quantificar a capacidade de produção de FN das próprias MPSs.

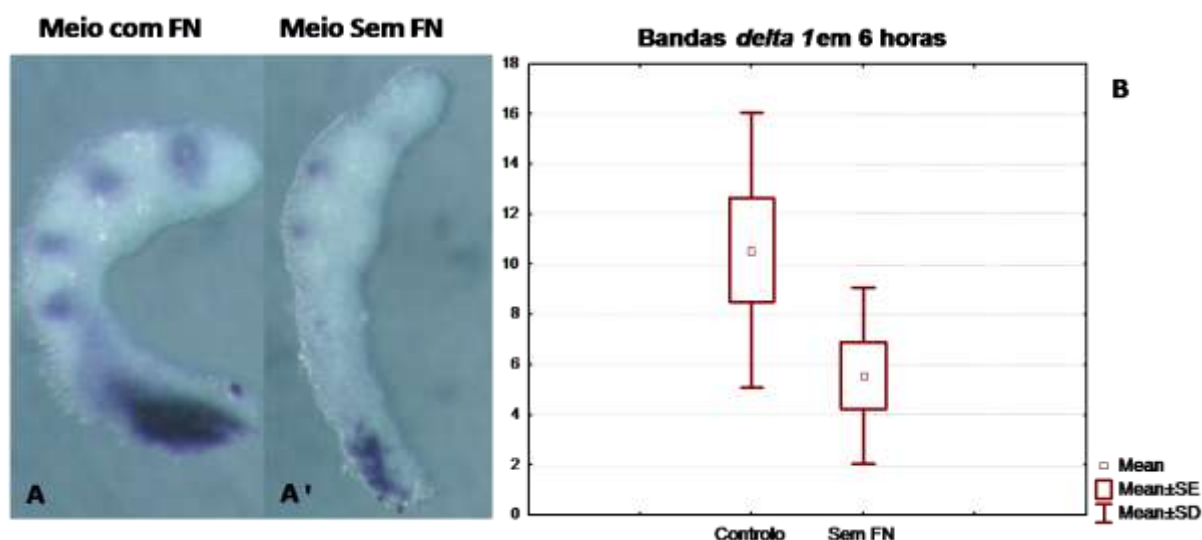


Fig. 14. Análise comparativa da expressão de RNAm de *delta1* em MPSs isoladas com pancreatina e cultivadas em meio, cujo soro contém FN (A) e em meio cuja FN do soro foi reduzida (A'). Nota-se que nos controlos, *delta1* é expressa de forma contínua na MPS e descontínua, formando em média 3,1 bandas na região anterior do explante (A); As MPSs cultivadas em meio com redução de FN mostram expressão restrita de *delta 1*, limitada a em média 2,1 bandas na região anterior e ausência parcial na MPS não segmentada (A'). Análise estatística do número de bandas formadas nas duas condições (B). Representação gráfica da média dos sómitos formados (dados transformados por potenciação e os valores médios comparados por t-test para variáveis dependentes). As barras representam o desvio padrão dos valores médios. O número de sómitos formados nas MPSs cultivadas na ausência de FN é inferior aos formados nos controlos ($p=0,02$)

As diferenças reveladas pela marcação de *delta 1* mostram diferenças tanto nos domínios caudais como nos rostrais dos explantes de MPSs. As cultivadas no meio normal expressaram o RNAm de *delta1* de forma contínua na região caudal, enquanto que nos experimentais houve uma diminuição de expressão neste domínio e por vezes ausência total de expressão ($n=7$ pares; Fig.14A A'). No domínio rostral foi verificado nos

experimentais, menos uma banda de expressão de *delta 1* do que nos controlos (n=7 pares; Fig.14A A'). A análise estatística do número de bandas formadas (dados transformados por potenciação) nas duas condições demonstrou que a redução da FN exógena afecta a segmentação molecular. Estes resultados indicam que a FN derivada da MPS não é suficiente para o progresso normal da segmentação molecular ($p=0,02$; Fig. 14B).

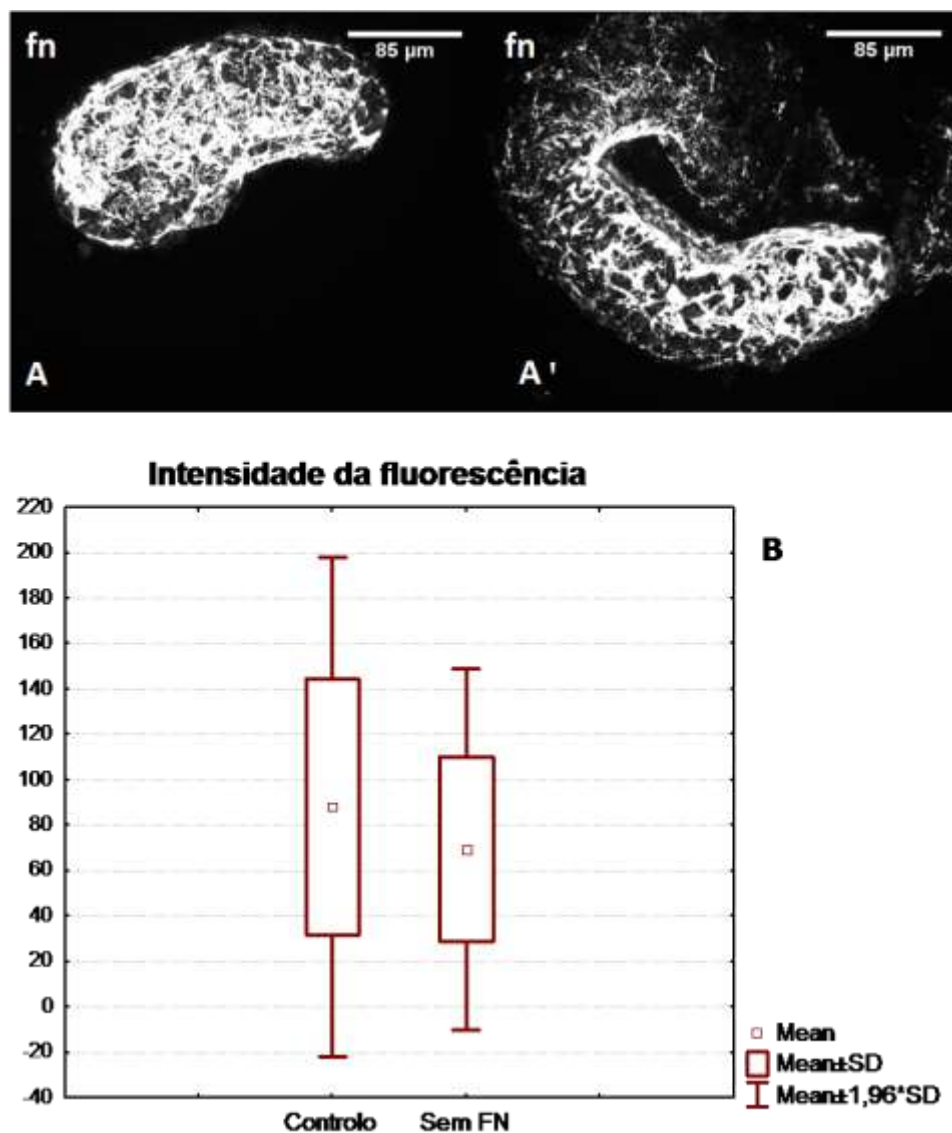


Fig. 15. Análise comparativa da presença de FN em MPSs isoladas com pancreatina e cultivadas em meio, cujo soro contém FN (A) e em meio cuja FN do soro foi reduzida (A'). Nota-se que a imunomarcagem para a FN é intensa em toda a porção da MPS controlo (A) e na experimental é evidente a diminuição da intensidade de uma extremidade à outra (A'). Análise estatística da quantificação da FN (B). Representação gráfica da média do resultado da quantificação (dados transformados por raíz quadrada). As barras representam o desvio padrão dos valores médios. Não se detectou uma diferença significativa entre MPSs pares ($p=0,11$)

Os resultados da imunofluorescência das MPSs cultivadas em meio, cujo soro contém FN, demonstram que, após 6 horas de culturas, houve uma reposição uniforme da matriz de FN,

que se mantêm intensa em toda a sua extensão rostral (Fig.15A). Nas MPSs experimentais, a FN tem uma distribuição também intensa numa das extremidades, demonstrando uma diminuição progressiva da intensidade da imunomarcacão de uma extremidade à outra (Fig. 15A'). Porém, a comparação da intensidade da fluorescência entre as MPSs controle e as experimentais não mostrou uma diferença significativa ($p=0,11$) ($n=4$ pares; Fig. 15A A').

4. Discussão

4.1. A matriz da fibronectina influencia a segmentação tanto ao nível morfológico como ao nível da expressão génica segmentar.

A segmentação é um processo importante para o desenvolvimento das estruturas metaméricas dos Vertebrados. Subjacentes ao surgimento destas estruturas estão dois fenómenos: (1) o estabelecimento de um padrão de expressão génica segmentar através da activação de uma complexa rede de sinalização e de controlo transcricional (Takahashi et al. 2007; Andrade et al. 2005; Saga, 2007) e (2) o estabelecimento da segmentação morfológica associada a dinâmicas celulares que inclui mudança de forma celular, de aumento de adesão célula-célula e célula-MEC e de diferenciação celular (Duband et al. 1987; Rifes et al. 2007; Martins et al. 2009). Apesar de se saber que estes dois processos devem estar interligados entre si, não há até a data estudos que apontam elementos reguladores em comum para os dois eventos.

Já foi demonstrado no ratinho, no peixe zebra e na galinha que a perturbação da FN tem efeitos na segmentação morfológica. Porém ainda não tinha sido estudado se esta matriz de FN afecta a segmentação molecular. Neste trabalho confirmou-se que a inibição da formação de fibrilhas de FN pelo fragmento de 70kDa perturba a segmentação morfológica. Curiosamente, os nossos resultados demonstram também uma influência directa ou indirecta entre a presença de uma matriz de FN e a expressão de dois genes envolvidos na segmentação molecular na MPS rostral, nomeadamente *delta1* e *meso1*. Mais especificamente, há formação de apenas 1,9 bandas *delta 1* em 6 horas (em vez de 3,4 verificados nos controlos) e há perda da sincronia de expressão de *meso1* entre a metade controlo e a metade experimental. Estes resultados indicam fortemente que a matriz de FN afecta a expressão génica envolvida na segmentação molecular.

O mecanismo por detrás deste efeito ainda é desconhecido. Postulamos que a perturbação da formação da matriz de FN e/ou a destruição da existente pode ter inibido a adesão celular (Bourdoulous et al. 1998; Mercurius e Morla, 1998) perturbando a comunicação entre as células que expressam Notch e delta e, por isso, ter afectado a sinalização Notch de uma forma indirecta.. Em alternativa, a matriz de FN pode, através do seu receptor integrina $\alpha\beta1$, induzir um evento de sinalização intracelular que afecte a via Notch. Tem-se verificado um “cross-talk” entre vias activadas por acção de integrinas e a via Notch durante a somitogénese (Julich et al. 2005) e noutros sistemas (Campos et al. 2005).

Verificamos que, na presença do fragmento de 70 kDa, em vez de se formar 4 sómitos e 4 bandas de expressão *delta1* em 6 horas como esperado, apenas se formam no máximo 2 sómitos e 2 bandas *delta1*. Tem sido descrito que com a adição do fragmento de 70kDa é impedida a ligação de mais FN à matriz existente e a matriz pre-existente é progressivamente degradada (Sottile e Hocking 2002). De facto, no caso da somitogénese, na presença deste fragmento durante 6 horas, a matriz de FN apresenta grandes buracos intercalados com densas fibrilhas, indicando um processo de degradação (Martins et al. 2009). No entanto verifica-se a formação de 1 a 2 sómitos, cuja metade caudal foi marcada pela banda *delta1*. Sugerimos assim que a presença do fragmento leva a uma perda progressiva de matriz de FN e por conseguinte (1) o progressivo afastamento das células da MPS rostral umas das outras, dificultando a sinalização Notch ou (2) essa perda progressiva da matriz de FN faz com que a sinalização por ela induzida deixa de acontecer. Neste momento não estamos em condições de distinguir entre estas duas possibilidades. Porém, em ambos os cenários, a segmentação não procede para além de 1-2 sómitos após a adição do fragmento de 70 kDa.

4.2. A sinalização Notch activa a expressão de *meso1* na MPS rostral.

Sabe-se que a rede de sinalização Notch tem um papel importante na padronização do corpo dos Vertebrados, inclusivamente na regulação da somitogénese (Conlon et al. 1995) (Hrabe de Angelis et al. 1997) e que a sinalização Notch é activada através de ligação célula-célula (Kimble e Simpson, 1997). Pensa-se que a sinalização Notch oscila na MPS entre um estado activo (ON) e um não activo (OFF) (Aulehla, Wehrle, Herrmann, & Entwicklungsbiologie, 2003) e que essa sinalização é necessária para a sincronização do relógio de segmentação nas células da MPS (Jiang et al. 2000; Ozbudak e Lewis 2008). Estudos feitos demonstraram que *mesp2* opera dentro desta rede de sinalização (Takahashi et al. 2003). Pensa-se que a sua transcrição é activada periodicamente por sinalização Notch (Yasuhiko et al. 2006) e que a sinalização Notch por sua vez é inibida por *mesp2* via L-fng (Dale et al. 2003; Morimoto et al. 2006). Esta relação é suportada por observação de implicações fenotípicas da perturbação nas duas sinalizações (Morimoto et al. 2006). Apesar de estes estudos terem sido feitos em embriões de ratinho, é provável que o mesmo ocorra em embriões de galinha.

Nós observamos que quando a sinalização Notch é inibida em culturas de explantes, por bloqueio da clivagem do seu domínio intracelular (NICD), a expressão de *meso1* desaparece depois de 3 ciclos de 90 minutos (i.e. 270 minutos). Portanto, este resultado sugere que Notch regulou positivamente a expressão de *meso1* até completar 3 ciclos de expressão, tendo sido inibida a sua transcrição, imediatamente a seguir. Tem se verificado

noutros estudos que *Mesp2* é regulado positivamente quando a oscilação de sinalização Notch alcançar o domínio anterior da MPS (Oginuma, Niwa, Chapman, & Saga, 2008) e *Mesp2* inibe a expressão de *delta1* na metade rostral dos sómitos. Portanto, para explicar os nossos resultados, sugerimos que as interações Notch que resultaram na activação da expressão de *meso1* já estavam desencadeadas quando foi aplicado o inibidor DAPT e que o efeito de bloquear a sinalização Notch só leva a inibição da expressão de *meso1* depois de 3 ciclos (270 minutos). Deste modo, no início da cultura, o *meso1* é expresso normalmente e inibe a expressão de *delta1* na parte rostral de 2 a 3 sómitos em formação, limitando a sua expressão ao domínio caudal destes 2 a 3 sómitos (nota que o último domínio de expressão *delta1* não é distinguível da sua expressão na MPS não segmentada, observando-se a formação de 1 ou 2 bandas de expressão *delta1*). Conforme o estado de oscilação de Notch com sinalização activa (ON) ou sem sinalização (OFF) no momento da aplicação de DAPT, assim é inibido mais cedo ou mais tarde, resultando numa diferença temporal de inactivação de Notch, por conseguinte na regulação de *meso1* e no número de bandas de expressão *delta1* (1 ou 2). Depois disso, a expressão de *meso1* desaparece, a expressão de *delta1* não é inibida na parte rostral do sómito presuntivo, permanecendo expresso em todas as células deste segmento. Esta interpretação dos nossos resultados sugere que a sinalização Notch activa o *mesp2/meso1* na região da frente de determinação (aproximadamente S-IV) apesar de só se verificar RNAm para estes genes no S-II (Saga 2007).

4.3. Ausência de Notch e de FN provocam efeitos parecidos na segmentação.

Uma comparação dos fenótipos obtidos com a inibição da fibrillogénese da FN e com a inibição da sinalização Notch demonstra que são bastante parecidos. Em ambos os casos formam-se 1-2 sómitos e 1-2 bandas de expressão de *delta1*, em média 1,9 e 1,7 respectivamente. De acordo com um estudo recente de Martins e colaboradores, a inibição de fibrillogénese de FN tem efeito sobre a segmentação morfológica de forma progressiva (Martins et al. 2009). Quantificação do tempo de formação dos 2 sómitos formados durante 6 horas de cultura, demonstrou que o primeiro sómito formou-se em 145 min e o segundo em 150 min seguido de uma paragem na segmentação morfológica (Martins et al. 2009). Verificou-se neste presente trabalho que, tal como no caso da inibição da fibrillogénese da FN, a inibição da sinalização Notch também provoca um atraso na formação dos sómitos e de seguida uma paragem. Apesar da severidade do efeito ser maior com o bloqueio da sinalização Notch, parece haver complementaridade entre o papel da matriz de FN e o da via de sinalização Notch na segmentação da MPS. Propomos assim que a matriz de FN

poderá desencadear uma via de sinalização que sinergiza com a sinalização Notch e, consequentemente, inibindo uma via ou outra, resultar em efeitos semelhantes.

4.4. A segmentação molecular é o balanço da conjugação da sinalização intrínseca à MPS e da dos tecidos envolventes.

Estudos realizados têm revelado que a MPS necessita de sinais da ectoderme sobrejacente para a segmentação morfológica (Borycki et al. 2000; Borycki et al. 1998; Correia et al. 2000; Palmeirim et al. 1998). Foi recentemente descrito que a contribuição principal da ectoderme para a segmentação morfológica é a sua produção de FN que é incorporada na matriz que envolve a MPS (Rifes et al. 2007). O isolamento da MPS dos tecidos circundantes (incluindo a ectoderme) afecta a segmentação morfológica, embora a expressão génica segmentar ocorre normalmente (Palmeirim et al. 1998). Isto leva a crer que MPSs são autónomas na sua capacidade de segmentação e que são capazes de recuperar a sua matriz endógena de FN destruída pela pancreatina, durante as 6 horas em cultura (Rifes et al. 2007) e expressar o *delta1* de uma forma segmentar, embora não ocorra segmentação morfológica (Palmeirim et al. 1998). Curiosamente, contrariamente a estas, as MPSs cultivadas na presença de um inibidor da montagem de matriz de FN, o fragmento 70kDa ou em meio depletado de FN, exibem menos bandas de expressão de *delta1* do que os controlos, indicando que não são capazes de segmentar normalmente.

Ainda neste trabalho, as experiências de inibição da fibrillogénese da FN revelaram que a recuperação desta matriz é dependente da concentração do inibidor da ligação FN-FN. Quanto maior a concentração do fragmento, menor parece ser a recuperação da matriz e maior é a severidade do efeito causado na expressão segmentar de *delta1*. À concentração de 100 e 50µg/ml do fragmento, as MPS dissociaram-se completamente, enquanto que à concentração de 10µg/ml do fragmento elas mantiveram-se em bom estado e não se verificou nenhuma anomalia relativamente ao controlo na expressão de *delta1*. Estas observações permitem-nos afirmar que na presença de concentrações elevadas do fragmento, todos os locais de ligação de FN são saturados, daí não há possibilidade de qualquer aproveitamento da FN produzida pela MPS (Rifes et al. 2007) e da FN presente no soro para a recuperação da matriz de FN durante as 6 horas de cultura, resultando na perda da adesividade celular e desagregação total da MPS. A concentrações baixas do fragmento é aproveitada a FN do meio para a formação de uma matriz mínima capaz de suportar a segmentação normalmente. Entre as duas possibilidades encontra-se a concentração de 25µg/ml que resulta na formação de em média 2 bandas *delta1* a marcar o estabelecimento molecular de 2 sómitos. Sugerimos que, a formação de 2 bandas em vez das 4 formadas nos controlos é justificada pelo aproveitamento de alguma FN do meio na recuperação de

uma matriz mínima, capaz de promover alguma sinalização às células, mas que esta só é suficiente para a especificação molecular de 2 sómitos.

No seu conjunto, estes resultados sugerem que a matriz de FN é não só essencial para a segmentação morfológica (George et al. 1993; Rifes et al. 2007), mas que desempenha também um papel importante no estabelecimento da segmentação molecular (visualizada através da expressão segmentar de *delta1*) na MPS anterior. Sugerem ainda que é preciso mais FN para sustentar a segmentação morfológica do que a segmentação molecular. Isto é evidente pela observação que MPSs isoladas com pancreatina e cultivadas em meio com soro durante 6 horas conseguem reconstituir uma matriz de FN suficiente para a expressão segmentar de *delta1* mas não para a segmentação morfológica. Além disso os nossos resultados preliminares de inibição de montagem de matriz de FN via $\alpha 5\beta 1$ (aplicando o péptido RGDS que inibe a ligação integrina-FN) apontaram para a mesma conclusão relativamente à necessidade de uma matriz mínima de FN para a expressão segmentar de *delta1*.

As nossas experiências de cultura de MPS em meio depletado de FN reforçam ainda mais a ideia de que a FN produzida pelas MPS não é suficiente e que normalmente a MPS depende de FN exógena. Verificamos que em sistema de culturas as MPSs isoladas com pancreatina não conseguem reconstituir uma matriz de FN que suporta a segmentação molecular, sem FN exógena, mas estes resultados não permitem saber se em sistemas in vivo a MPS também precisa de FN exógena. Estudos mais aprofundados por outras vias e que permitem extrapolar para sistemas in vivo serão necessários para confirmar se esta hipótese é realmente correcta.

4.5. A matriz de fibronectina participa na regulação da expressão de *delta1* na MPS caudal?

Embora não se saiba as especificidades do envolvimento da FN na regulação da segmentação molecular, já se sabe que a expressão génica segmentar na ausência de uma matriz de FN é diferente da expressão na sua presença. Conforme visto anteriormente, as MPS isoladas são capazes de aproveitar a FN do meio e segmentar-se normalmente, entretanto quando a FN for depletada deste meio a expressão de *delta1* é severamente alterada. Formam-se menos bandas de expressão *delta1* na parte rostral e em vez de uma expressão contínua em toda a extensão da MPS não segmentada, verifica-se uma ausência parcial e por vezes total de expressão neste domínio da MPS.

O efeito caudal sugere-nos a levantar algumas hipóteses explicativas: (1) Além do contacto celular para a activação de sinalização Notch poderá ser necessário o contacto com uma

quantidade mínima de FN para induzir alguma via de sinalização que faz expressar *delta1*, directamente ou indirectamente; (2) Segundo dados preliminares anteriores (Lara Carvalho, dados não publicados), MPS isoladas com pancreatina deixam de expressar *Fgf8*. A matriz de FN que é destruída neste caso poderá ser necessária para manter o mRNA de *Fgf8* e sem ele pode não haver condições para as células sobreviverem e/ou expressarem *delta1*, daí o seu desaparecimento na MPS caudal; (3) As células da MPS, na ausência da matriz, podem morrer por apoptose (denominado “anoikis” (Frisch e Francis 1994; Reddig e Juliano 2005)) que levaria a cessão de qualquer expressão génica. Apesar de ser necessário fazer mais experiências para testar qual das hipóteses explicativas é a mais correcta, está claro a influência e a participação da matriz de FN na sinalização subjacente à expressão de *delta1* na MPS não segmentada.

Em resumo, a síntese de uma matriz de FN na MEC é assegurada pelo fornecimento de FN exógena pela ectoderme e mostrou ser essencial para manter as dinâmicas celulares e a sinalização necessárias para o prosseguimento da segmentação tanto morfológica como molecular. Evidências sugerem que interacção entre a matriz da FN e a sinalização celular subjacentes à segmentação molecular passa pela indução directa ou é induzida indirectamente através da modulação da sinalização Notch.

Bibliografia

- Andrade, R. P., Palmeirim, I., e Bajanca, F. (2007). Molecular clocks underlying vertebrate embryo segmentation: A 10-Year-Old hairy-Go-Round. *Birth Defects Research* 81, 65-83.
- Andrade, R.P., Pascoal, S., e Palmeirim, I. (2005). Thinking clockwise. *Brain Research Review* 49, 114–119.
- Aulehla, A., e Johnson, R. L. (1999). Dynamic expression of lunatic fringe suggests a link between notch signaling and an autonomous cellular oscillator driving somite segmentation. *Developmental Biology* 61, 49 - 61.
- Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., e Herrman, B.G. (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Developmental Cell* 4, 395–406.
- Baker, R. E., Schnell, S., e Maini, P. K. (2003). Formation of vertebral precursors: Past models and future predictions. *Journal of Theoretical Medicine* 5, 23–35.
- Barrios, A., Poole, R. J., Durbin, L., Brennan, C., Holder, N., e Wilson, S. W. (2003). Eph/Ephrin Signaling Regulates the Mesenchymal- to-Epithelial Transition of the Paraxial Mesoderm during Somite Morphogenesis. *Current Biology* 13, 1571-1582.
- Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., e Kageyama, R. (2003). Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes & Development* 17, 1451-6.
- Blancar, M. A., Crossley, P. H., Peters, K. G., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Martin, G. R., e Rutter, W. J. (1995). Mesol, a basic-helix-loop-helix protein involved in mammalian presomitic mesoderm development. *Developmental Biology* 92, 5870-5874.
- Borycki, A., Brown, A. M. e Emerson, C. P., Jr (2000). Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *Development* 127, 2075-2087.
- Bourdoulous, S., Orend, G., Mackenna, D. A., Pasqualini, R., e Ruoslahti, E. (1998). Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression. *Journal of Cell Biology* 143, 267-276.
- Buchberger, A., Bonneick, S., Klein, C., e Arnold, H. (2002). Dynamic expression of chicken cMeso2 in segmental plate and somites. *Developmental Dynamics* 223:108–118.
- Campos, L. S., Decker, L., Taylor, V., e Skarnes, W. (2005). Notch, EGFR and β 1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells. *Journal of Biological Chemistry* 281, 5300-5309.
- Christ, B., e Ordahl, C. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology* 191, 381-96.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G., and Rossant, J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121, 1533–1545.

- Cooke, J., e Zeeman, E.C. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*. 58, 455–476.
- Correia, K. M., e Conlon, R. A. (2000). Surface ectoderm is necessary for the morphogenesis of somites. *Mechanisms of Development* 91, 19-30.
- Dale, J.K., Maroto, M., Dequeant, M.L., Malapert, P., McGrew, M., e Pourquié, O.(2003). Periodic Notch inhibition by Lunatic Fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* 421, 275–278.
- Diez, R., e Storey, K. G. (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *BioEssays* 26, 857– 869.
- Dottori, M., Hartley, L., Galea, M., Paxinos, G., Polizzotto, M., Kilpatrick, T., Bartlett, P. F., Murphy, M., Kontgen, F. e Boyd, A. W. (1998). EphA4 (Sek1) receptor tyrosine kinase is required for the development of the corticospinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13248-13253.
- Duband, J. L., Dufour, S., Hatta, K., Takeichi, M., Edelman, G. M. e Thiery, J. P. (1987). Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *Journal Cell Biology*. 104, 1361-1374.
- Dubrulle, J., McGrew, M. J., e Pourquié, O. (2001). FGF Signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal. *Cell* 106, 219-232.
- Dubrulle, J., e Pourquié, O. (2004). Fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 427, 419-422.
- Dunty, W. C., Biris, K. K., Chalamalasetty, R. B., Taketo, M. M., Lewandoski, M., e Yamaguchi, T. P. (2008). Wnt3a/beta-catenin signaling controls posterior body development by coordinating mesoderm formation and segmentation. *Development* 135, 85-94.
- Durbin, L., Brennan, C., Shiomi, K., Cooke, J., Barrios, A., Shanmugalingam, S., Guthrie, B., Lindberg, R., e Holder, N. (1998). Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. *Genes & Development* 12, 3096-3109.
- Forsberg, H., Crozet, F. e Brown, N. A. (1998). Waves of mouse Lunatic fringe expression, in four-hour cycles at two-hour intervals, precede somite boundary formation. *Current Biology*. 8, 1027-30.
- Frisch, S. M., e Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Cancer Research* 124, 619-626.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., e Yamada, K. M. (2001). Transmembrane extracellular matrix– cytoskeleton crosstalk. *Nature* 2, 793-805.
- George, E. L., Georges-labouesse, E. N., Patel-king, R. S., Rayburn, H., e Hynes, R. O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119, 1079-1091.

- Georges-labouesse, E. N., George, E. L., e Raybubn, H. (1996). Mesodermal development in mouse embryos mutant for fibronectin. *Development Dinamics* 207, 145-156.
- Gibb, S., Zagorska, A., Melton, K., Tenin, G., Vacca, I., Trainor, P., Maroto, M., e Dale, J. K. (2009). Interfering with Wnt signalling alters the periodicity of the segmentation clock. *Developmental Biology* 330, 21-31.
- Glazier, J. A., Zhang, Y., Swat, M., Zaitlen, B., e Schnell, S. (2008). Coordinated action of N-CAM, N-cadherin, EphA4, and ephrinB2 translates genetic prepatterns into structure during somitogenesis in chick. *Current Topics in Developmental Biology* 81, 205-47.
- Gossler, A., e Hrabe de Angelis, M. (1998). Somitogenesis. *Current Topics in Developmental Biology* 38, 225-287.
- Hamburger V., e Hamilton HL. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Development Dinamics* 195:231–272.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J. II., e Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717- 721.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. e Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.
- Ishikawa, A., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kokubo, H., Kanno, J., Inoue, T., e Saga, Y. (2004). Mouse Nkd1, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mechanisms of Development* 121, 1443-53.
- Jiang, Y., Haddon, C., e Lewis, J. (2000). Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* 408, 475-479.
- Jouve, C., Palmeirim, I., Henrique, D., Beckers, J., Gossler, A., Ish-horowcz, D., e Pourquié, O. (2000). Notch signaling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* 127, 1421–1429.
- Jülich, D., Geisler, R. e Holley, S. A. (2005). Integrin α 5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somitogenesis. *Developmental Cell* 8, 575-586.
- Kimble, J., e Simpson, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13, 333–361
- Koshida, S., Kishimoto, Y., Ustumi, H., Shimizu, T., Furutani-Seiki, M., Kondoh, H., e Takada, S. (2005). Integrin α 5-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Developmental Cell* 8, 587-98.
- Kragtorp, K. a., e Miller, J. R. (2007). Integrin α 5 is required for somite rotation and boundary formation in xenopus. *Developmental Dynamics* 236, 2713-20.
- Lash, J. W., Seitz, A. W., Cheney, C. M. e Ostrovsky, D. (1984). On the role of fibronectin during the compaction stage of somitogenesis in the chick embryo. *Journal of Experimental Zoology* 232, 197-206.

Lash, J. W. e Yamada, K. M. (1986). The adhesion recognition signal of fibronectin: a possible trigger mechanism for compaction during somitogenesis. *Somites in Developing Embryos* 118, 201-208.

Lash, J.W., Linask, K.K., e Yamada, K.M. (1987). Synthetic peptides that mimic the adhesive recognition signal of fibronectin: differential effects on cell-cell and cell-substratum adhesion in embryonic chick cells. *Developmental Biology* 123, 411–420.

Leimeister, C., Dale, K., Fischer, a., Klamt, B., Hrabe de Angelis, M., Radtke, F., McGrew, M. J., Pourquié, O., e Gessler, M. (2000). Oscillating expression of c-Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors. *Developmental Biology* 227, 91-103.

Luminy, C. D., e City, K. (2003). Periodic Notch inhibition by Lunatic Fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* 2000, 275-278.

Maden, M., e Storey, K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65-79.

Mao, Y., e Schwarzbauer, J. E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology* 24, 389-99.

Martins, G. G., Rifes, P., Amândio, R., Rodrigues, G., Palmeirim, I., e Thorsteinsdóttir, S. (2009). Dynamic 3D cell rearrangements guided by a fibronectin matrix underlie somitogenesis. *PLoS ONE* 4(10), e7429.

McDonald, J. A., Quade, B. J., Broekelmanns, T. J., Lachances, R., Forsmans, K., Hasegawaeqll, E., e Akiyamaell, S. (1987). Fibronectin's cell-adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast pericellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 262, 2957-2967.

McGrew, M. J., Dale, J. K., Fraboulet, S. e Pourquié, O. (1998). The Lunatic Fringe gene is a target of the molecular clock linked to segmentation in avian embryos. *Current Biology*. 8, 979-982.

McKeown-Longo, P. J., e Mosher, D. F. (1985). Interaction of the 70,000-mol-wt amino-terminal fragment of fibronectin with the matrix-assembly receptor of fibroblasts. *Journal Cell Biology*. 100, 364-374.

Mercurius, K. O., e Morla, A. O. (1998). Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circulation Research*. 82, 548-556.

Moreno, T. A., e Kintner, C. (2004). Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during. *Developmental Cell* 6, 205-218.

Morimoto, M., Kiso, M., Sasaki, N., e Saga, Y. (2006). Cooperative Mesp activity is required for normal somitogenesis along the anterior-posterior axis. *Developmental Biology* 300, 687-698.

Morimoto, M., Takahashi, Y., Endo, M., e Saga, Y. (2005). The Mesp2 transcription factor establishes segmental borders by suppressing Notch activity. *Nature* 435, 354-359.

- Nakajima, Y., Morimoto, M., Takahashi, Y., Koseki, H., e Saga, Y. (2006). Identification of Epha4 enhancer required for segmental expression and the regulation by Mesp2. *Development* 133, 2517-25.
- Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H., e Saga, Y. (2002). Hypomorphic Mesp allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. *Development* 129, 2473-2481.
- Oginuma, M., Niwa, Y., Chapman, D. L., e Saga, Y. (2008). Mesp2 and Tbx6 cooperatively create periodic patterns coupled with the clock machinery during mouse somitogenesis. *Development* 135, 2555-2562.
- Ozbudak EM, Lewis J. (2008). Notch signalling synchronizes the zebrafish segmentation clock but is not needed to create somite boundaries. *PLoS Genetics*. 4(2), e15.
- Packard, D. S. Jr (1980). Somitogenesis in cultured embryos of the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *American Journal of Anatomy* 158, 83-91.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., e Pourquié, O. (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639-48.
- Palmeirim, I., Dubrulle, J., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., e Pourquié, O. (1998). Uncoupling segmentation and somitogenesis in the chick presomitic mesoderm. *Developmental Genetics* 23, 77-85.
- Pankov, R., e Yamada, K. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 115, 3861-3863.
- Reddig, P. J., e Juliano, R. L. (2005). Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer and Metastasis Reviews* 24, 425–439.
- Rifes, P., Carvalho, L., Lopes, C., Andrade, R. P., Rodrigues, G., Palmeirim, I., e Thorsteinsdóttir, S. (2007). Redefining the role of ectoderm in somitogenesis: a player in the formation of the fibronectin matrix of presomitic mesoderm. *Development* 134, 3155-3165.
- Saga, Y. (2007). Segmental border is defined by the key transcription factor Mesp2, by means of the suppression of Notch activity. *Developmental Dynamics* 236, 1450-1455.
- Sottile, J., e Hocking, D. C. (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Molecular Biology of the Cell* 13, 3546 -3559.
- Sosic, D., Brand-Saberi, B., Schmidt, C., Christ, B. e Olson, E. N. (1997). Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube-derived signals. *Developmental Biology* 185, 229-243.
- Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H., e Saga, Y. (2000). Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nature Genetics* 25, 390-396.

- Takahashi, Y., Hiraoka, S., Kitajima, S., Inoue, T., Kanno, J., e Saga, Y. (2005). Differential contributions of Mesp1 and Mesp2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development* 132, 787-96.
- Takahashi, Y., Takagi, A., Hiraoka, S., Koseki, H., Kanno, J., Rawls, A., e Saga, Y. (2007). Transcription factors Mesp2 and Paraxis have critical roles in axial musculoskeletal formation. *Developmental Dynamics* 236, 1484-1494.
- Takahashi, Y., Inoue, T., Gossler, A., e Saga, Y. (2003). Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* 130, 4259-4268.
- Tam, P., Goldman, D., Camus, A. e Schoenwolf, G. (2000). Early events of somitogenesis in higher vertebrates: allocation of precursor cells during gastrulation and the organization of a meristic pattern in the paraxial mesoderm. *Current Topics in Developmental Biology* 47, 1-32.
- Vermot, J., e Pourquié, O. (2005). Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos. *Nature* 435, 215-220.
- Wada, N., Tanaka, H., Ide, H., e Nohno, T. (2003). Ephrin-A2 regulates position-specific cell affinity and is involved in cartilage morphogenesis in the chick limb bud. *Developmental Biology* 264, 550-563.
- Watanabe, T., Sato, Y., Saito, D., Tadokoro, R., e Takahashi, Y. (2009). EphrinB2 coordinates the formation of a morphological boundary and cell epithelialization during somite segmentation. *Pnas* 106, 7467-7472.
- Yang, J. T., Bader, B. L., Kreidberg, J. A., Ullman-cullere, M., Trevithick, J. E., e Hynes, R. O. (1999). Overlapping and independent functions of fibronectin receptor integrins in early mesodermal development. *Developmental Biology* 215, 264-277.
- Yasuhiko, Y., Haraguchi, S., Kitajima, S., Takahashi, Y., Kanno, J., e Saga, Y. (2006). Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Pnas* 103, 3651-3656.